

Année 1973-1974

THÈSE

Série E. n° 14

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Solange TROUPEL

ETUDE CRITIQUE ET APPLICATIONS DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ANTIGENE CARCINOEMBRYONNAIRE

Soutenue le : 10 juillet 1974 devant la commission d'examen :

M. J. BORY	Président
M. H. RENAULT	Examineurs
M. J. AGNERAY	
M. P. BURTIN	Invité

Année 1973-1974

THÈSE

Série E. n° 14

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Solange TROUPEL

ETUDE CRITIQUE ET APPLICATIONS DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ANTIGENE CARCINOEMBRYONNAIRE

Soutenue le : 10 juillet 1974 devant la commission d'examen :

M. J. BORY	Président
M. H. RENAULT	Examineurs
M. J. AGNERAY	
M. P. BURTIN	Invité

THÈSE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Mémoire à l'usage)

par

Solange TRINQUET



ETUDE CRITIQUE
DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE
DE L'ANTIGÈNE CARCINOEMBRYONNAIRE

Remise le 10 mai 1973 devant la commission d'examen

M. J. BORY	Président
M. H. RENARD	Membre
M. J. STENKAY	Membre
M. R. BURTON	Membre

A ma famille,

A mes amis,

Avec toute mon affection.

A Monsieur le Professeur J. BORY

qui a bien voulu accepter de présider
notre jury de thèse.
Qu'il veuille trouver ici l'expression de
notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur H. RENAULT

qui nous a suivie tout au long de notre
carrière depuis l'internat. Il nous a initiée
avec sa grande compétence à l'utilisation
des radioéléments dans la recherche expé-
rimentale et clinique. Nous avons bénéfi-
cié de sa clarté d'esprit et de la rigueur
de son enseignement.
Qu'il trouve dans nos remerciements,
l'expression de notre fidèle attachement.

A Monsieur le Professeur J. AGNERAY

qui, par l'intérêt porté à notre travail
et par ses conseils judicieux prodigués
avec la plus grande bienveillance, nous a
permis de mener à bien ce mémoire.
Qu'il en soit vivement remercié et qu'il
accepte l'expression de notre profonde
reconnaissance.

A Monsieur P. BURTIN
Directeur de Recherche au CNRS

Il est à l'origine de ce travail et a bien voulu, malgré ses lourdes tâches, en assumer la direction. Il nous a accueilli dans son laboratoire où nous avons toujours pu bénéficier de ses conseils.
Nous lui exprimons nos vifs remerciements.

A Sabine von KLEIST
Chargée de recherche à l'INSERM

Sa collaboration dont nous ne saurions oublier la valeur nous a toujours été profitable.
Nous la remercions et l'assurons de notre amicale reconnaissance.

A Jacqueline GIBOUDEAU

auprès de laquelle nous avons toujours trouvé une aide efficace et patiente.
Qu'elle soit assurée de notre amitié.

A toute l'équipe des techniciennes du laboratoire du Docteur
P. Burtin à l'IRSC de Villejuif

que nous remercions chaleureusement de
l'aide qu'elles nous ont apportée.

Nous remercions également Jean RAPIN, et le personnel du Service de Biophysique, INSERM, Hôpital Saint-Antoine, que nous avons mis à contribution.

Nous ne saurions oublier, Messieurs les Professeurs A. LEMONNIER, M. GUERNET et M. HAMON, qui nous ont engagée et soutenue dans notre carrière universitaire.

INTRODUCTION

L'objet de ce travail était à l'origine, la mise au point d'une technique de dosage radioimmunologique de l'antigène carcino-embryonnaire, pour étudier les variations cliniques de son taux sanguin.

La découverte de l'antigène carcino-embryonnaire est due à GOLD et FREEDMAN en 1965 (1-2). Ces chercheurs avaient mis en évidence dans l'extrait perchlorique de carcinomes coliques humains, des antigènes qui ne se trouvent pas dans la muqueuse colique adulte normale. L'identité antigénique entre ces antigènes et ceux du tissu endodermique foetal est la raison pour laquelle GOLD et FREEDMAN les nommèrent «Carcino-Embryonic antigens of the digestive tract (CEA)». Par la suite ces auteurs ne parlèrent plus que d'un antigène carcino-embryonnaire.

A la même époque von KLEIST et BURTIN en 1966 (3) et 1969 (4), avaient démontré dans les carcinomes coliques et l'intestin humain foetal, l'existence d'un certain nombre d'antigènes et, parmi eux, l'antigène carcino-embryonnaire.

Puis, THOMSON et coll. en 1969 (5) ont prouvé par une méthode de dosage radioimmunologique, que l'antigène carcino-embryonnaire est aussi un antigène circulant. Ils déterminent un seuil au-dessus duquel l'ACE pouvait être détecté, et ce, uniquement dans les sérums de malades atteints de cancer digestif.

C'est à ces derniers résultats que nous nous sommes d'abord intéressée, étant donné l'importance très grande que pouvait présenter le dosage sanguin de cet antigène si, réellement, il était aussi spécifique.

Puis, lors de la mise au point du dosage, la multiplicité des différents paramètres impliqués dans l'équilibre radio-immunologique, et, la parution de publications (6 à 14), infirmant les premières statistiques de THOMSON et coll. (15), nous ont amenée à orienter notre travail dans le sens d'une étude critique des techniques, plutôt que dans leurs applications cliniques.

Au cours de notre mémoire, nous nommerons l'antigène carcino-embryonnaire : ACE, ainsi que les chercheurs de langue française le font habituellement.

Dans le chapitre I, nous définissons l'antigène carcino-embryonnaire.

Dans le chapitre II, nous allons rappeler quelques principes généraux des dosages radioimmunologiques, ainsi que les raisons du choix de l'isotope radioactif, utilisé pour les marquages de l'ACE.

Nous passons en revue dans le chapitre III, les réactifs utilisés au cours du dosage de l'antigène carcino-embryonnaire. Ce chapitre comporte deux parties. La première traite de l'antigène, sa préparation et son marquage ; la deuxième de l'antisérum, sa préparation et son titrage.

Le chapitre IV est consacré à la mise au point des techniques du dosage radioimmunologique de l'antigène carcino-embryonnaire.

Enfin, dans le dernier chapitre nous rapportons les résultats obtenus dans les applications expérimentales et cliniques.

Chapitre I

A — L'ANTIGENE CARCINO-EMBRYONNAIRE (ACE)

La mise en évidence des antigènes tumoro-spécifiques est due à des expériences faites sur l'animal. Les premières études immunologiques sur les tumeurs humaines aboutissant à des résultats apparemment valables, sont celles de HIRSZFELD et Coll. et de WITEBSKY, qui en 1929 ont publié à peu près simultanément leurs résultats (16-17).

HIRSZFELD et coll. les premiers, en 1932, signalent la parenté entre le tissu cancéreux et le tissu embryonnaire chez l'homme (18).

Il a fallu attendre une trentaine d'années pour que l'intérêt revienne sur ce problème, à la suite de la publication des travaux d'ABELEV et de ses collaborateurs (19 à 21). Leurs études systématiques sur les antigènes spécifiques des hépatomes de la souris ont mené à la découverte de l' α -foeto-protéine. TATARINOV a montré le premier (22) que cette globuline sérique est également chez l'homme caractéristique du cancer primaire du foie.

En 1965 GOLD et FREEDMAN (23) décrivent dans les adénocarcinomes du colon humain, d'autres antigènes tumoro-spécifiques dont la présence a été démontrée par des immun sérums préparés selon deux techniques :

- a — Injection d'extraits tumoraux à des lapins, et épuisement des anti-sérums obtenus par des extraits salins de muqueuse colique adulte normale,
- b — Injection de ces mêmes extraits tumoraux, mais à des lapins rendus tolérants dès la naissance aux extraits de colon normal.

Dans une deuxième publication (24), ils signalent l'origine foetale de leurs antigènes et précisent qu'ils ne se trouvent que dans les tumeurs épithéliales du tube digestif dérivées de l'endoderme. Ils introduisent alors le germe de «Carcino-Embryonic antigens».

En 1966, von KLEIST et BURTIN (25) par immunisation d'animaux avec des extraits tumoraux obtiennent des antisérums qui, après absorption par des extraits tissulaires normaux, leur permettent la mise

en évidence de trois antigènes dans les extraits perchloriques de tumeurs coliques : l'un d'entre eux était absent de la muqueuse colique adulte normale mais était retrouvé dans l'organe homologue foetal. Il pouvait s'agir de l'antigène carcino-embryonnaire de GOLD et FREEDMAN, ce qui a d'ailleurs été vérifié par échange de réactifs entre les deux équipes (26). Les deux autres antigènes se rencontraient également dans plusieurs tumeurs extra coliques, et dans certains tissus normaux. Ces antigènes étaient donc des antigènes tissulaires normaux, mais apparemment présents en plus grande quantité dans les extraits tumoraux.

L'antigène carcino-embryonnaire se situe à la surface des cellules ainsi que les études en immunofluorescence l'ont précisé (27). Les travaux de von KLEIST et BURTIN (28) ont montré que l'antigène était associé à la membrane plasmique de la cellule cancéreuse et plus précisément au pôle sécrétant des cellules glandulaires. Cette orientation vers la lumière de la glande suggère qu'il s'agit d'un antigène sécrété. D'autre part GOLD et coll. par microscopie électronique l'ont mis en évidence dans le glycocalyx (29).

Von KLEIST avance deux hypothèses sur le lieu de synthèse de l'antigène. Dans la première hypothèse, il serait synthétisé dans le cytoplasme et concentré dans la partie libre de la membrane avant d'être excrété ; dans la deuxième hypothèse, l'antigène pourrait être mis en évidence électivement dans la partie libre de la membrane cellulaire, parce qu'il serait masqué dans les zones accolées (30).

GOLD a affirmé que l'antigène carcino-embryonnaire provoquait la synthèse d'auto anticorps agglutinant les hématies recouvertes par l'ACE (31). Mais aucune autre équipe n'a pu confirmer ces résultats (32-33).

THOMSON et coll. (34) ont relaté que l'antigène carcino-embryonnaire est un antigène circulant dans le sang.

Plus récemment, l'immunofluorescence a mis en évidence l'ACE dans de nombreuses muqueuses coliques non cancéreuses, et, tout d'abord (35-36) dans les muqueuses péri-tumorales. Ceci n'est pas étonnant puisqu'il y existe également des anomalies biochimiques, moins prononcées mais de même type, que celles rencontrées dans les néoplasmes, par exemple des variations du taux de synthèse des acides nucléiques, et des altérations des isoenzymes de la lactico-deshydrogénase. L'ACE a été également retrouvé dans les polypes du colon et du rectum (37), dans la muqueuse colique de malades atteints de colites ulcéreuses, dans la muqueuse hémorroïdale et, enfin, dans la muqueuse colique des enfants jusqu'à 7 ans (38). L'ACE n'a pas été identifié dans

les muqueuses gastriques non cancéreuses, sauf en cas d'intestinalisation, mais on le rencontre presque toujours dans les épithéliomas bien différenciés (39).

Nous nous sommes limitée à présenter les travaux concernant la localisation digestive de l'ACE et sa circulation dans le sang, bien que nous sachions que, actuellement de nombreuses publications font état de la présence de l'ACE dans divers organes normaux et dans les différents fluides de l'organisme. Il ne semble donc pas possible actuellement de considérer l'ACE comme spécifique de cancer.

Peut-on le retrouver dans la muqueuse colique réellement normale même chez l'adulte ? (40-41) ; ou sa présence reflète-t-elle un processus inflammatoire éventuellement responsable d'une prolifération accrue de cellules épithéliales ? La question n'est pas tranchée.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

L'ACE est une glycoprotéine, PAS positive, dont la copule peptidique est comprise entre 35 et 40 %. Il est soluble dans l'acide perchlorique 0,6 M et le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation mais précipite à 100 % de saturation. Ceci conditionne sa préparation, son isolement et sa purification.

Sa migration électrophorétique est celle d'une β -globuline (42).

Les valeurs trouvées pour sa constante de sédimentation sont variables : 5,1 - 6,9 et 8,02 S pour KRUPPEY et coll. (43), 8, 5 S pour MACH et coll. (44), et 2,4 - 4,1 et 7,2 S pour von KLEIST (45) qui propose d'expliquer la variation de ces résultats par une probable polymérisation de la molécule.

Cet antigène résiste à la chaleur, il peut supporter une température de 99° C pendant 40 minutes.

Les enzymes comme la trypsine, la chymotrypsine, la R-nase et D-nase sont sans action.

COMPOSITION ET ANTIGENICITE

La composition en acides aminés de l'ACE a été déterminée par analyse chromatographique gaz-liquide. Les résultats obtenus par différentes équipes sont rapportés dans le tableau n° 1. Les analyses de

DEGAND et coll. sont effectuées par cette méthode sur des ACE (3000 et 2287) que nous avons utilisés comme antigènes de référence.

	Tuberville et coll. (46)	Terry et coll. (47)	Banjo et coll. (48)	Degand et coll. non publié	
				3000	2287
Asparagine ou Ac Aspar- tique	16,8*	15,1	15,9	13,19	14,52
Thréonine	10,3	8,3	9,3	8,31	8,49
Sérine	10,7	9,6	11,4	10,84	10,72
Glutamine ou Ac. Gluta- mique	11,1	10,1	11,0	11,45	11,48
Proline	8,1	11,1	8,0	7,96	7,20
Glycine	5,7	5,2	5,5	7,01	6,17
Alanine	6,6	5,8	5,9	5,81	6,23
Valine	—**	7,0	6,8	6,29	6,64
Cystine-Cystéine	0,1	—	0	1,33	Traces
Méthionine	0	0,1	0	0	0
Isoleucine	5,7	4,9	5,1	4,33	4,64
Leucine	9,0	8,8	9,3	8,05	8,26
Tyrosine	3,8	3,9	2,5	4,32	4,37
Phénylalanine	2,6	2,4	2,1	2,38	2,71
Lysine	3,4	2,5	2,5	2,72	3,08
Histidine	2,2	1,8	1,3	1,95	1,89
Arginine	3,9	3,6	3,4	4,08	3,56

Tableau n° I

Composition de l'ACE en acides aminés

* Les taux sont exprimés en résidus d'ac. aminés/100 résidus.

** Les taux n'ont pas été déterminés.

Ces acides aminés sont ceux d'une glycoprotéine typique.

BANJO et coll. (49), et DEGAND et coll. (non publié) ont également procédé à l'analyse de la copule glycanique, après hydrolyse acide et chromatographie gaz-liquide, les mono-saccharides identifiés sont :

	Banjo et coll.	Degand et coll.	
		2287	3000
L-Fucose	0,15	0,26	0,34
D-Mannose	0,49	0,40	0,45
D-Galactose	0,62	0,54	0,50
N-Acétyle D-Glucosamine	0,97	0,68	0,62
Ac. Sialique	0,24	0,05	0,13

Tableau n° II

Composition de l'ACE en monosaccharides

Les résultats sont exprimés en μ Mol/mg d'ACE.

La molécule d'ACE ne contient pas de N-Acétyle-Galactosamine bien que GOLD et coll. aient trouvé que l'ACE avait une activité de groupe A (50).

Afin de mettre en évidence la structure des groupements déterminants antigéniques, BANJO et coll. (51) ont préparé par hydrolyse enzymatique à l'aide de Nagase, des fragments immunologiquement actifs, éprouvés par dosage radio-immunologique. Les glycopeptides immunologiquement actifs sont de faible poids moléculaire. Ils ont une haute teneur en N-Acétyle D-Glucosamine, acide aspartique ou asparagine et acide glutamique ou glutamine. Ces auteurs ont tenté d'inhiber la liaison ACE-antiACE par des composés synthétiques tel le 2 acétamide-1-N-(4-L-aspartyle)-2-deoxy b-D-glucopyranosylamine. Le résultat de ces études suggère que la liaison entre l'asparagine et le N-acétyle-D-glucosamine peut être invoquée dans l'immunoréactivité.

La séquence complète des constituants n'est pas connue. Une séquence partielle des vingt quatre acides aminés de l'extrémité N terminale a été établie par TERRY et coll. (52).

CRITERES DE PURETE

Il n'y a pas d'ACE de synthèse qui pourrait servir d'étalon absolu. Chaque équipe utilise en général son propre antigène dont les critères de pureté reposent essentiellement sur les propriétés physiques et immunologiques. L'ACE doit avoir un seul pic en ultracentrifugation, une seule bande en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, et ne donner qu'une seule bande dans la région des β globulines en immunoélectrophorèse contre un antiserum non absorbé.

L'échange réciproque de réactifs permet de vérifier que la réactivité immunologique des différents antigènes est comparable.

Actuellement on procède à la préparation et au contrôle d'un ACE qui pourrait être utilisé comme étalon international.

B — LES «CEA - LIKE» SUBSTANCES **ou substances apparentées immunologiquement à l'ACE**

Elles présentent une réaction croisée avec l'antigène carcino-embryonnaire. Nous préférons continuer à les appeler «CEA like» substances, expression généralement admise. Le NCA («non specific cross reacting antigen») et le NCA II appartiennent à cette catégorie.

Le NCA est l'un des trois antigènes mis en évidence par von KLEIST et BURTIN dans les extraits de tumeur colique, lors de l'isolement de l'antigène carcino-embryonnaire. Il n'est ni spécifique d'organe, ni de cancer, d'où son nom. C'est une glycoprotéine, de mobilité électrophorétique β . Son poids moléculaire est inférieur à celui de l'ACE (constante de sédimentation 3,5 à 4 S.) (53).

Cet antigène a été comparé avec certains autres trouvés par différentes équipes et dénommés : CEX (54), NGP (55). Il semble s'agir de la même substance.

Le NCA II est différent du NCA et de l'ACE (56).

Les substances «CEA like» sont importantes. Elles imposent une purification particulière des antisérums anti-ACE qui possèdent des anticorps réagissant avec elles.

Le NCA existe dans le sérum humain, comme l'ont montré BURTIN et coll. (57).

Les extraits perchloriques de poumons humains normaux, et ceux de rate, en contiennent des quantités notables et, une absorption des antisérums par un extrait perchlorique de l'un de ces organes, élimine les anticorps anti-NCA, ainsi d'ailleurs qu'une certaine proportion des anticorps anti-ACE.

Chapitre II

LE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

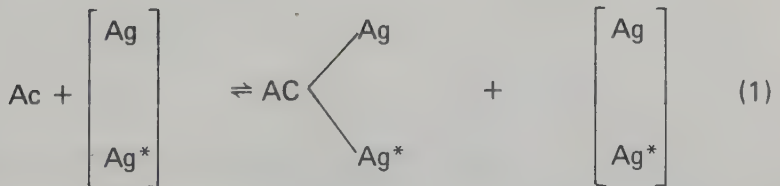
GENERALITE

Dans leurs recherches sur le métabolisme de l'insuline marquée à l'iode 131, BERSON et coll. en 1956 (58) ont découvert que le sérum des malades traités à l'insuline, contenait une globuline capable de fixer l'insuline 131I. Cette fixation était réversible et pouvait être évitée par l'addition d'un excès d'insuline non marquée. Cette globuline se révélait être un anticorps-anti-insuline.

Quelques années plus tard, en 1960, YALOW et BERSON (59) ont imaginé une méthode radio-immuno-chimique, reposant sur le phénomène décrit plus haut et permettant de réaliser le dosage plasmatique de l'insuline. Cette technique a, par la suite, été étendue à la mesure de nombreuses substances antigéniques.

A – ETUDE THEORIQUE DE LA METHODE RADIO-IMMUNOLOGIQUE (60) - (61)

Le principe de la détermination radio-immuno-chimique consiste en une dilution isotopique dans un environnement antigène-anticorps. L'analyse est fondée sur la liaison compétitive d'un antigène marqué (Ag^*) (1) et non marqué (Ag) vis-à-vis de l'anticorps spécifique (Ac).



Si leur affinité est identique, les antigènes marqués et non marqués se lient à l'anticorps dans le même rapport que celui où ils se trouvent dans la solution.

(1) * astérisque représentant la radioactivité.

C'est une analyse par saturation, nom donné par EKINS (62) pour décrire une méthode dans laquelle on effectue «une saturation progressive des sites de fixation d'un agent liant spécifique par le composé que l'on souhaite doser».

Il faut que les concentrations relatives des constituants soient telles qu'à l'équilibre, une partie de l'antigène marqué reste libre dans le milieu. Dans ces conditions, il est possible de déterminer le rapport entre la radioactivité, du complexe antigène-anticorps et celle de l'antigène libre.

Ce rapport est généralement appelé B/F de «bound» (lié) et «free» (libre), termes se rapportant à l'antigène marqué.

C'est une fonction inverse de la concentration de l'antigène non marqué ; c'est-à-dire que le rapport B/F diminue lorsque la concentration en antigène non marqué augmente. On peut tracer une courbe d'étalonnage dite courbe «standard d'inhibition» en déterminant les B/F correspondant à des quantités variables mais connues d'antigène non marqué, et fixes d'antigène marqué, mises en présence d'une même quantité d'anticorps. Il est facile alors de déterminer les concentrations en antigènes dans des échantillons inconnus. Il suffit, en opérant dans des conditions identiques, de chiffrer le B/F obtenu en fonction de la courbe standard d'inhibition.

La forme générale de la courbe reliant B/F à la concentration en antigène non marqué est donnée dans la figure n° 1.

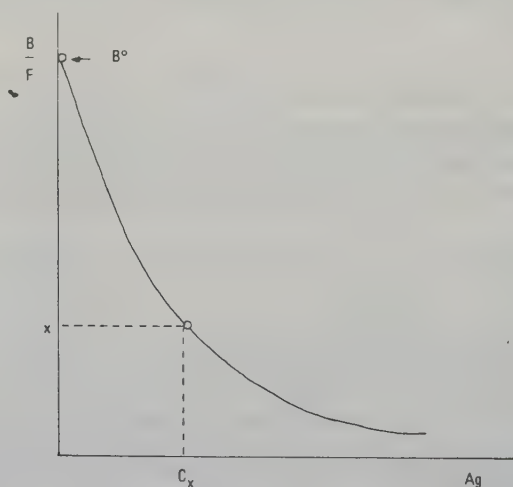


Figure n° 1

Courbe radioimmunologique classique

Le rapport $\frac{B}{F}$ (B_0) ayant la valeur la plus élevée, correspond à la liaison antigène marqué anticorps, en l'absence d'antigène non marqué.

Nous allons brièvement étudier certaines considérations théoriques relatives au dosage radioimmunologique.

ANALYSE THEORIQUE DE LA RELATION BIMOLECULAIRE ENTRE L'ANTIGENE ET L'ANTICORPS

1) — La relation bimoléculaire

La réaction schématisée dans l'équation (1) est complexe. En effet, deux phénomènes agissant en sens inverse se superposent :

- une dilution isotopique ;
- une réaction antigène-anticorps obéissant à la loi d'action de masse (Arrhenius et Madsun, 1902) (63).

En effet, si l'on ajoute de l'antigène non marqué au milieu d'incubation, on observe un accroissement de la quantité du complexe antigène-anticorps formé et une diminution de la quantité d'antigène marqué, fixée à l'anticorps.

En pratique, on opère de telle façon que l'anticorps soit rapidement saturé pour que n'intervienne plus que la dilution isotopique. C'est la raison pour laquelle, ainsi que nous l'avons déjà dit plus haut, l'antigène marqué doit être en excès par rapport à la quantité d'anticorps.

2) — Les anticorps

L'énergie de l'interaction entre l'antigène et l'anticorps est liée à la constante d'équilibre K de la réaction :

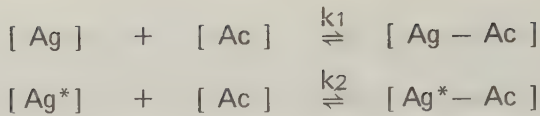


Plus K est élevé, plus la sensibilité est grande.

3) — L'Antigène

Propriété de l'antigène marqué

Si l'on examine la relation (1), elle peut être décomposée en deux équations :

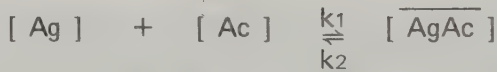


Pour que l'antigène marqué déplace l'antigène non marqué de ses sites de fixation sur l'anticorps, il faut que les constantes k_1 et k_2 soient très proches l'une de l'autre, c'est-à-dire que l'antigène marqué réagisse de façon comparable à l'antigène non marqué. Il est donc nécessaire que le marquage agisse le moins possible, sur les propriétés de liaisons de l'antigène.

4) — Sensibilité et précision

Nous allons considérer que la réaction entre l'antigène et l'anticorps est du premier ordre. Cette hypothèse est vraisemblable puisqu'aux dilutions utilisées, la probabilité d'une réaction secondaire entre l'antigène et le complexe antigène-anticorps est très faible, même lorsque l'antigène est multivalent.

Selon la loi d'action de masse la réaction entre l'antigène (Ag) et l'anticorps (Ac) pour former le complexe antigène-anticorps $\overline{\text{AgAc}}$ est formulée ainsi :



La constante d'équilibre K est donnée par :

$$\frac{[\overline{\text{AgAc}}]}{[\text{Ag}][\text{Ac}]} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

Si nous appelons $[\text{Ac}_0]$ la concentration molaire de l'anticorps dans la dilution de l'antisérum employé, B l'antigène lié $[\text{AgAc}]$ et F l'antigène libre $[\text{Ag}]$ nous avons :

$$B/F = K ([\text{Ac}_0] - B) \quad (2)$$

La courbe représentant B/F en fonction de B est une droite de pente $-K$ et d'ordonnée à l'origine $K [\text{Ac}_0]$.

Si la concentration en antigène est infiniment petite par rapport à $[\text{Ac}_0]$, on a aussi :

$$B \ll [\text{Ac}_0] \text{ et nous pouvons écrire :}$$

$$\text{Lim. } B/F = K [Ac \circ] \text{ quand } B \rightarrow 0$$

Pour évaluer les facteurs entrant dans la sensibilité de l'essai, nous allons dériver l'équation (2), c'est-à-dire exprimer B/F en fonction de la concentration totale en antigène : $[A]$.

Nous calculerons également les relations de b par rapport à $[A]$ où b représente le rapport de l'antigène lié à l'anticorps à la quantité totale d'antigène, c'est-à-dire, la fraction d'antigène lié.

$$b = \frac{B}{[A]}$$

Sensibilité

C'est la plus petite quantité d'antigène entraînant un déplacement du complexe anticorps-antigène marqué. Elle peut être définie par l'écart des valeurs prises par B/F ou b en fonction de la concentration en antigène :

$$\frac{d(B/F)}{d[A]} \quad \text{ou} \quad \frac{db}{d[A]}$$

C'est-à-dire que l'on peut l'exprimer comme la limite du rapport :

$$d(B/F) / d[A] \text{ lorsque } A \rightarrow 0$$

Pour dériver cette fonction nous devons résoudre l'équation (2), en remplaçant F par sa valeur :

$$F = [A] - B$$

A partir de l'expression compliquée en résultant, on obtient des séries convergentes binomiales dont l'analyse révèle que si la concentration en antigène marqué est telle que $[Ag^*] \ll [Ac \circ]$ nous pouvons supprimer les termes de second ordre de l'équation et :

$$\frac{d(B/F)}{d[A]} \approx \frac{(B/F)}{(B/F) + 1} K$$

Une analyse plus poussée montre que la sensibilité maximale est obtenue quand $b = 1/3$, c'est-à-dire lorsque $B/F = 0,5$ et elle est donnée par :

$$\frac{d(B/F)}{d[A]} \# -\frac{K}{3}$$

$$\frac{db}{d[A]} \# -\frac{4K}{27}$$

Ainsi, la sensibilité dépend de la constante d'équilibre K et est maximale quand :

$$[Ag^*] \ll [Ac_o]$$

et lorsque l'antisérum est dilué de telle façon que :

$$B/F = K ([Ac_o] - B) \# K [Ac_o] = 0,5$$

Précision

La précision est exprimée par le rapport :

$$\frac{d(B/F)}{d[A]/[A]} \text{ ou } \frac{db}{d[A][A]}$$

Elle est maximale sous des conditions tout à fait différentes. Ainsi quand Ac_o est suffisamment élevé pour avoir :

$$K [Ac_o] \gg B/F$$

et quand :

$$B = b \cdot [A] \# [Ac_o]$$

Dans ces conditions, la précision maximale devient la même pour tous les anticorps, elle est indépendante de K, et elle est donnée par la relation :

$$\frac{db}{d[A]/[A]} \# -b$$

L'intégration de cette équation donne :

$$\text{Log } b \# \text{Log } [Ac_o] - \text{Log } [A]$$

Si l'on porte $\text{Log } b = f(\text{Log } [A])$, on obtient une ligne droite de pente -1 , valable pour tous les anticorps.

La précision devient donc maximale quand $b \rightarrow 1$ donc pour des concentrations élevées d'anticorps.

Il n'est pas nécessaire d'employer un antisérum concentré puisqu'on a pratiquement 50 % du maximum de précision lorsque :

$$B/F = 1 \quad \text{et} \quad K [Ac_o] = 10 B/F$$

De plus, comme les antisérums sont hétérogènes, l'emploi d'un antisérum de titre élevé peut entraîner une diminution de la précision, s'il s'y trouve un anticorps de moindre affinité, mais à haute concentration, se liant à une fraction importante de l'antigène marqué. Il est donc préférable d'avoir un antisérum à haute affinité pour l'antigène, plutôt qu'un titre très élevé en anticorps. YALOW et BERSON en 1964 et 1968 (64 - 65), ont également montré que, pour un antisérum donné, la sensibilité de l'analyse augmente avec la dilution.

5) — Activités spécifiques

Nous avons vu que la sensibilité maximale était obtenue pour une dilution de l'antisérum telle que $K [Ac_o] = 0,5$ et lorsque $[A]$ tend vers zéro, c'est-à-dire en l'absence d'antigène non marqué et, avec la concentration la plus faible possible d'antigène marqué.

Il est par conséquent important de posséder un antigène marqué ayant la plus grande activité spécifique compatible avec sa stabilité.

6) — Remarque

Si un rapport B/F de 0,5 entraîne la plus grande sensibilité, celle-ci est diminuée de façon peu importante pour des $B/F = 1$ ou 1,5. C'est la raison pour laquelle, dans la pratique, afin d'augmenter les possibilités de dosages, les courbes d'inhibition sont généralement effectuées avec $B/F \neq 1$.

7) — Représentation des courbes d'étalonnage

La courbe d'étalonnage est assez difficile à exprimer pour les raisons suivantes :

— Difficulté de linéariser la courbe moyenne et différences dans la précision des points de la courbe, suivant son domaine.

— L'erreur sur les points de la courbe est d'autant plus grande que la concentration en antigène est plus faible.

Deux types de représentation sont généralement utilisés :

$$Y = f [A] \quad \text{et} \quad Y = f (\text{Log } [A])$$

$$\text{avec } Y = B/F \quad \text{ou} \quad Y = B/T$$

où T représente la quantité totale d'antigène marqué.

Ces courbes ne sont pas linéaires, ainsi que le montre la figure n° 2.

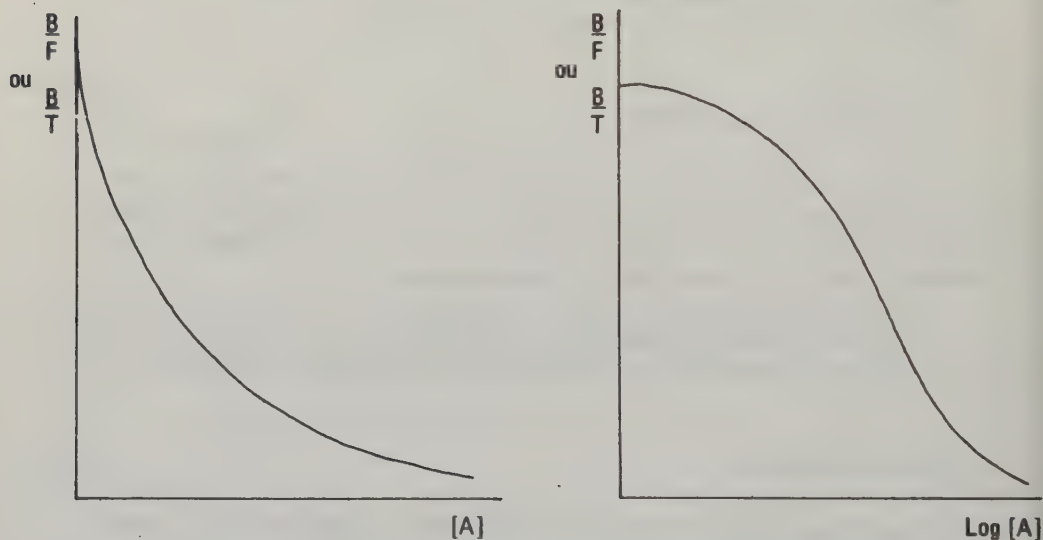


Figure n° 2

Deux exemples de représentation de la courbe d'étalonnage

Plusieurs procédés peuvent être employés pour linéariser ces courbes : ainsi la transformation Logit et les transformations Probit et Arc sin $\sqrt{P}$. Nous n'en parlerons pas, ne les ayant pas employés au cours de ce travail.

Mode d'expression choisi

Nous exprimons nos courbes d'étalonnage en pourcentage d'inhibition du rapport B/T trouvé en l'absence d'antigène froid.

Considérons ce rapport de valeur X, et les valeurs X' prises par B/T en fonction de la quantité d'antigène froid :

$$100 - \frac{(X' \times 100)}{X} = \% \text{ d'inhibition}$$

X correspond à la valeur maxima du rapport B/T, c'est-à-dire à 100 % de la radioactivité possible du complexe anticorps-antigène dans les conditions expérimentales étudiées, donc à 0 % d'inhibition.

Les logarithmes des valeurs de l'antigène sont portées en abscisse et le pourcentage d'inhibition en ordonnée, ainsi que l'on peut le voir dans la figure n° 3.

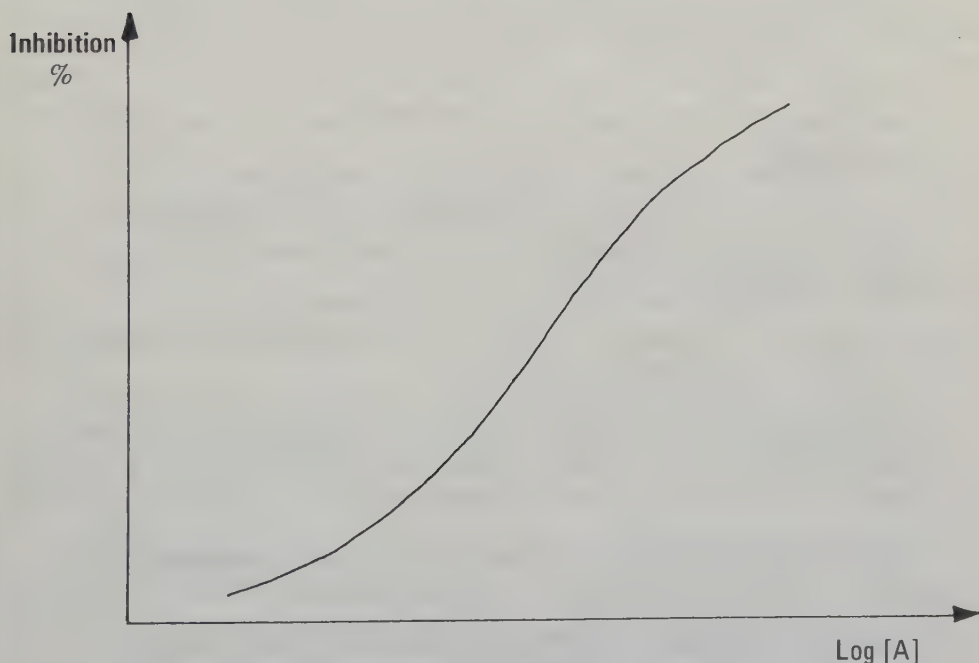


Figure n° 3

Mode de représentation utilisé pour la courbe d'étalonnage

B — MARQUAGE DES PROTEINES

Il existe principalement deux méthodes de marquage des protéines :

- le marquage in vivo à partir de précurseurs marqués et qui conduit surtout à l'étude des métabolismes ;
- le marquage in vitro par **substitution** d'un isotope stable par un isotope radioactif (^{12}C remplacé par ^{14}C ; ^1H remplacé par ^3H).

Les protéines peuvent être marquées ainsi par la méthode de Wilzbach (66) qui est une exposition à un gaz tritié.

Plus habituellement, le marquage se fait par **addition** d'atomes radioactifs. Les plus utilisés sont les isotopes de l'iode 127, l'iode 125 et l'iode 131.

Choix de l'isotope

Rappelons qu'un isotope est un corps ayant le même numéro atomique (Z identique), mais un poids atomique A différent. Il possède les mêmes propriétés chimiques puisque la structure électronique ne change pas.

Les isotopes radioactifs de l'iode sont nombreux, mais seuls trois sont intéressants.

- ^{125}I émetteur ($X \gamma$) de faible énergie, photons de 35 Kev par capture électronique et photons de 27 Kev par conversion interne. La période est de 59,9 jours.
- ^{131}I émetteur ($\gamma \beta$), photons de 364 Kev et une énergie β moyenne de 195 Kev. La période est de 8,04 jours.
- ^{132}I émetteur ($\gamma \beta$), photons de 1,7 Kev et une énergie β moyenne de 490 Kev. La période est de 2,3 heures. Il a donc une demi-vie extrêmement courte qui rend son emploi difficile.

Ainsi que la plupart des expérimentateurs en radioimmunologie, nous avons utilisé l'iode 125, pour les raisons suivantes :

- sa demi-vie relativement longue facilite grandement son utilisation ;
- l'absence de rayonnement β , réduit l'autodestruction de la molécule, et la basse énergie des rayonnements γ (27 Kev) et roentgen (35 Kev), diminue le risque d'irradiation des utilisateurs ;

- son efficacité de comptage, proportionnelle au nombre de photons produits, et inversement proportionnelle à l'énergie des rayonnements, est deux fois plus grande que celle de l'iode 131, car il émet 144 photons pour 100 désintégrations contre 80 pour l'iode 131, et son énergie est dix fois plus faible ;
- au contraire de l'iode 131, l'iode 125 peut être produit sans quantité notable d'entraîneur, ce qui est très important pour le bon rendement des marquages.

En effet l'irradiation des cibles en réacteur, (oxyde de Tellure pour l'iode 131 et Xenon pour l'iode 125), conduit à l'obtention de plusieurs isotopes de l'iode et les préparations obtenues contiennent :

- de l'iode 127 et de l'iode 129 dans l'iode 131 ;
- de l'iode 126 et de l'iode 127 dans l'iode 125.

Les schémas de préparation de ces isotopes sont reportés dans les figures n° 4 et 5 (67).

Dans le cas de l'iode 131, il a été démontré que pour une irradiation supérieure à 3 jours, le rapport $131/127$ est indépendant du flux, et varie de 0,15 à 0,30. Pratiquement, dans une solution fraîchement préparée, l'iode 131 constitue seulement environ 20 % de la teneur en iode, (5 à 40 %). L'intervalle de temps écoulé depuis l'activation, diminue encore ce pourcentage en fonction de sa durée.

L'iode 131 peut également être préparé à partir de l'Uranium 275, mais les rendements ne sont pas meilleurs.

Théoriquement, il y a : $8,03 \mu\text{g}$ d'iode par curie d'iode 131, mais en fait, la quantité est beaucoup plus importante selon les échantillons, pouvant aller jusqu'à $100 \mu\text{g}$.

L'iode 125 au contraire, ne contient que 1 à 6 % d'iode 126, et, comme la section d'irradiation du Xenon, 126 est petite, la quantité d'iode 127 formée est faible. En général l'iode 125 correspond à 80 à 95 % de l'iode total.

Théoriquement, il y a $57 \mu\text{g}$ d'iode par curie d'iode 125, en réalité, cette quantité est de l'ordre de $70 \mu\text{g}$.

Une revue générale des propriétés de l'iode 125 a été donnée par MYERS et VANDERLEEDEN en 1960 (68).

BALE et coll., ainsi que BERSON et YALOW en 1966, ont étudié les qualités de l'iode 131 (69) (70).

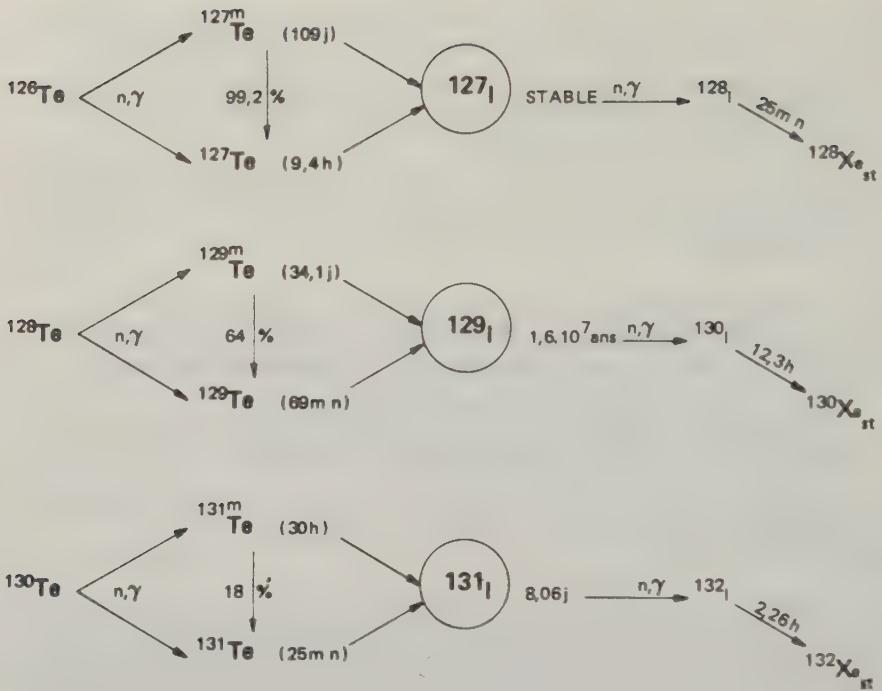


Figure n° 4 (1)
Irradiation de Tellure naturel

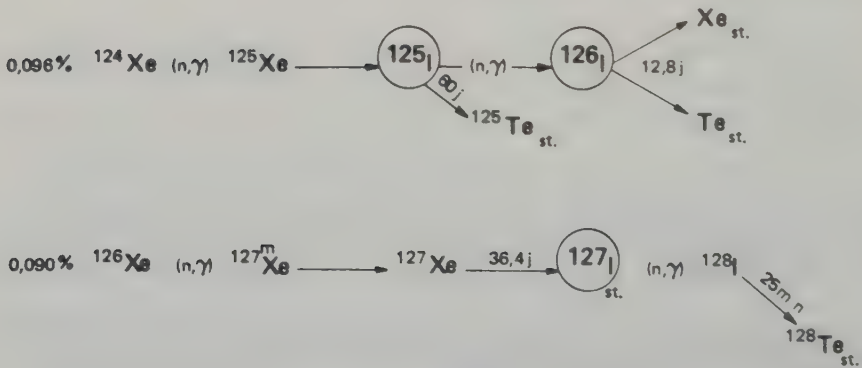


Figure n° 5 (1)
Irradiation de Xenon naturel

(1) D'après "Techniques radioimmunologiques" 1972 - INSERM

PROPRIETES CHIMIQUES DE L'IODE

L'iode est un halogène qui occupe la classe VII dans la classification de Mendeleïeff. De numéro atomique 53, il possède 53 protons et 74 neutrons dans son noyau, autour duquel gravitent 53 électrons périphériques.

Sa position dans la classe VII est conférée par sa structure électronique : 7 électrons sur la couche périphérique. Cet halogène est tantôt électronégatif, tantôt électropositif, correspondant à différents états d'oxydation.

Ceux-ci sont résumés ci-dessous :

- 1	--
0	
+ 1	oxydation
+ 5	
+ 7	+

L'état d'oxydation - 1 correspond à l'iode le moins oxydé, dit réduit. C'est l'iode minéral, qui n'existe que sous forme de sels, les iodures.

A l'état 0, correspond l'iode atomique, dont la combinaison moléculaire est l'iode organique I_2 , ou iode moléculaire. Il n'existe pas à l'état naturel et est instable à la température ambiante.

A l'état d'oxydation + 1, correspondent les hypo-iodites, sels de l'acide hypoiodeux (HIO), et le monochlorure d'iode, ICl . Cet état est le seul souhaitable pour la fixation sur les protéines.

A l'état d'oxydation + 5, correspondent les iodates, sels de l'acide iodique (HO_3) et à l'état + 7 les périodates, sels de l'acide périodique (HO_7 , n H_2O).

FIXATION SUR LA PROTEINE

Pour se fixer sur les groupements électronégatifs de la protéine, l'iode doit nécessairement être oxydé au degré + 1.

1) – Fixation spécifique :

L'Iode se fixe sur les groupes tyrosils contenus dans la protéine. La fixation de I^+ sur ce groupement est une liaison moléculaire de type semi-polaire. C'est une substitution électrophile en série aromatique. La répartition des atomes d'Iode sur les groupements tyrosils et entre les molécules n'est pas homogène. L'analyse des dérivés iodés après hydrolyse des protéines a montré qu'il existe des molécules non marquées, des molécules avec un seul atome (la majorité) et des molécules à plusieurs atomes 2 et exceptionnellement 3.

2) – Fixation non spécifique :

Elle concerne la fixation sur les groupements thiols et histidyls.

A pH légèrement alcalin (voisin de 8), l'iodation se fait préférentiellement sur les groupements thyrosils, un pH acide favorise la fixation non spécifique et un pH alcalin, la formation d'agrégats.

DIFFERENTES TECHNIQUES DE MARQUAGE

Plusieurs méthodes peuvent être employées pour l'iodation des substances protéiques.

Le mécanisme des réactions chimiques exactes et la nature de l'agent iodant est encore à débattre (HUGHES, 1966) (71). On admet généralement que la substance active est $H_2 O I^+$ (HUGHES, 1957) (72).

Les premiers essais cohérents ont été réalisés en 1950 par HUGHES et STRAESSLER (73) lors du marquage de la sérum-albumine. La méthode utilisait l'Iode organique en équilibre dans une solution d'iodure de potassium et la protéine en tampon bicarbonaté à pH 9,5 – 10.



En 1951, FRANCIS et coll. (74) publient une variante de cette technique dans laquelle l'Iode provient de la réaction Iodate-Iodure en milieu acide.

En 1956, Mac FARLANE (75) oxyde l'iodure radioactif par l'eau oxygénée.

Pour tous ces procédés, le rendement est inférieur à 50 % et une forte activité spécifique ne peut être obtenue, puisque à partir de l'I

organique, seul un atome sur deux peut se fixer sur la protéine.

En 1958, Mac FARLANE (76) décrit la technique au monochlorure d'iode où tous les atomes d'iode peuvent se fixer sur la molécule. Cette technique a été modifiée pour améliorer le rendement, la séparation protéine marquée iode libre, et l'adapter au marquage de petites quantités de protéines (HELMKAMP) (77).

En 1962, HUNTER et GREENWOOD découvrent une nouvelle méthode utilisant un oxydant exogène : la chloramine T (78). D'autres oxydants sont maintenant également employés, ainsi la lacto-péroxydase (79).

Enfin, en 1964 ROSA et coll. publient (80) une technique d'iodation par électrolyse qui donne des rendements élevés et qui est facilement contrôlable. Cette technique est utilisée de façon semi-industrielle par la SORIN et le CEA (1). Elle nécessite un équipement spécialisé, et de ce fait, son emploi est réservé à certains laboratoires.

Pour les dosages radioimmunologiques, la méthode de choix est celle décrite par GREENWOOD et coll. en 1963 (81), où la chloramine T est l'agent d'oxydation. C'est la méthode que nous avons employée. Elle permet l'obtention des hautes activités spécifiques nécessaires à la sensibilité du dosage radioimmunologique en utilisant des radioactivités assez faibles (de l'ordre du mCi). Les méthodes plus anciennes (MAC FARLANE, 1958 (82) ; YALOW et BERSON, 1960 (83)), nécessitaient des taux beaucoup plus élevés, de l'ordre de 20 à 80 mCi, qui augmentaient les risques d'irradiation durant les marquages.

Cette technique a également l'avantage de permettre le marquage de quantités très faibles de protéines, de l'ordre du microgramme, ce qui pour nous est important, car l'obtention de l'ACE demande une préparation longue et délicate à partir d'un matériel relativement difficile à obtenir.

C — REALISATION PRATIQUE GENERALE DE LA METHODE RADIOIMMUNOLOGIQUE

La réalisation d'un dosage radioimmunologique requiert :

(1) SORIN : Centro ricerche Nucleari di Saluggia
CEA : Commissariat à l'Energie Atomique.

1) - des réactifs

- un antigène pur
- un antigène marqué dont l'immunoréactivité doit être identique ou aussi voisine que possible
- un antisérum monospécifique

2) — une méthode de séparation du complexe antigène marqué — anticorps afin de pouvoir en déterminer la radioactivité.

Deux façons d'opérer sont possibles, elles sont schématisées dans la figure n° 6.

Dans la première méthode :

a) l'antigène marqué et non marqué sont ajoutés en même temps à la dilution de l'antisérum. Les antigènes entrent en compétition, pour se fixer sur les sites de l'anticorps suivant leur concentration dans la solution.

Dans la deuxième méthode :

b) l'antigène non marqué est ajouté seul à l'antisérum. Après un certain temps de préincubation, l'antigène marqué est ajouté, et, puisque les liaisons antigènes-anticorps sont réversibles (BERSON et YALOW (84)), il se produit un échange entre l'antigène marqué et l'antigène non marqué, dépendant de la durée du temps d'incubation. Cette dernière méthode est généralement considérée, comme étant plus sensible (HALES et RANDLE 1965 (85)).

Au cours du chapitre suivant, nous allons traiter de ces différents paramètres.

PRINCIPE DE L'ANALYSE PAR SATURATION

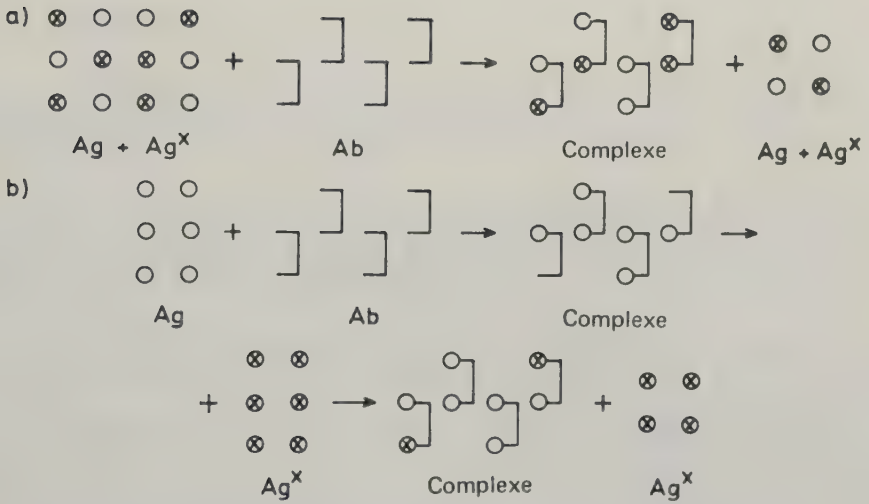


Figure n° 6

Ag et Ag* représentent l'antigène non marqué et marqué

Chapitre III

DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE L'AGE LES REACTIFS

A – L'ANTIGENE NON MARQUE

L'antigène non marqué est l'ACE isolé par extraction et purification à partir de cancers coliques et de leurs métastases essentiellement hépatiques.

L'ACE que nous avons employé a été isolé selon trois techniques différentes, à partir d'une préparation identique d'extraits semi-purifiés obtenus selon la méthode suivante :

Sur la tumeur homogénéisée dans l'eau déminéralisée à raison d'une partie de tissu pour deux parties d'eau :

a) Extraction par l'acide perchlorique à une concentration finale de 5 p. cent ;

b) Centrifugation à 10.000 rpm pendant 30 minutes dans une centrifugeuse MSE ;

c) Précipitation par du sulfate d'ammonium à saturation du surnageant ajusté à pH 7,5 par NaOH 2 N. La quantité nécessaire de sulfate d'ammonium cristallisé est calculée en fonction du volume de la solution ;

d) Redissolution dans de l'eau déminéralisée du précipité recueilli après centrifugation ;

e) Dialyse pendant trois jours contre de l'eau déminéralisée ;

f) Nouvelle centrifugation du dialysat, décantation du surnageant et lyophilisation. On détermine alors sur une partie aliquote la concentration en protéines par la méthode au biuret.

Ces extraits peuvent être purifiés selon l'une des trois techniques

suivantes :

-- La première comporte deux filtrations sur colonne de Séphadex G 200, en tampon Tris 0,15 M, pH 8,2, ou parfois d'une filtration sur Sephadex G 200 suivie d'une filtration sur Sepharose 4 B. Si cette séparation est précédée d'une électrophorèse préparative, la fraction β globuline est celle qui est passée sur la colonne ; en sortie de colonne, l'ACE est contenu dans le premier pic.

— La deuxième est un procédé par immuno-absorption : on réalise une fixation sélective de l'ACE contenu dans l'extrait semi-purifié sur un antisérum anti ACE spécifique, polymérisé par la glutaraldéhyde, selon la technique de AVRAMEAS et TERNYNCK (86). Après la formation du complexe qui nécessite un contact de 4 heures à la température du laboratoire, et le lavage du polymère, on procède au décrochage de l'antigène en l'éluant par un tampon glycine-HCl 0,3 M à pH 2,2. Ces éluats sont ensuite neutralisés par une solution M de phosphate bipotassique, et dialysés 24 heures contre de l'eau déminéralisée. Ils sont concentrés par perventilation. Une purification supplémentaire par filtration sur colonne de Séphadex G 200, est parfois nécessaire.

--- La troisième est une extraction immunopercblorique décrite par BURTIN et CHAVANEL (87). Les extraits semi-purifiés sont mis en contact avec un volume variable d'antisérum, d'après leur teneur en protéine. On doit avoir 2 à 3 mg de protéines pour un ml d'antisérum afin de précipiter tous les anticorps. Le mélange est incubé 1 heure à 37°, puis 18 à 36 heures à + 4° C. Le précipité recueilli par centrifugation est lavé plusieurs fois avec une solution de pH 7,4 (0,15 M en chlorure de sodium et 0,1 M en tampon phosphate), jusqu'à ce que le liquide de lavage ne contienne plus que des traces de protéines, ce qui est vérifié par lecture spectrophotométrique à 280 m μ . La densité optique doit être inférieure à 0,02.

Le précipité est ensuite mis en suspension dans un tampon glycine-HCl 0,3 M à pH 2,2 (2 ml pour 10 ml d'antisérum introduits au départ) et agité 30 minutes. On ajoute alors un volume égal d'acide perchlorique 1,2 M et on agite de nouveau pendant 30 minutes à la température du laboratoire.

Par centrifugation on sépare :

— un surnageant (contenant l'ACE) qui est immédiatement neutralisé par NaOH 5N, et dialysé contre de l'eau courante, puis contre de l'eau déminéralisée pendant 3 jours.

— un précipité qui est de nouveau extrait par l'acide perchlorique.

Une troisième extraction perchlorique est effectuée si la densité optique à 280 m μ du deuxième surnageant est supérieure à 0,100.

Les différents surnageants sont dialysés et contrôlés séparément, puis mélangés avant la lyophilisation.

Quel que soit le mode d'obtention, la pureté de l'ACE est vérifiée par des techniques immunologiques, comme nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent.

B — L'ANTIGENE MARQUE

1 - Principe de la technique de marquage utilisée

Ainsi que nous l'avons indiqué précédemment, nous avons choisi la technique à la chloramine T.

La chloramine T est le sel disodique du dérivé monochloré de la parasulfonamide toluène :



A un pH compris entre 7,0 et 8,5, la chloramine T en solution aqueuse libère de l'acide hypochloreux (ClOH) qui se comporte comme un oxydant vis-à-vis de l'iode, le transformant rapidement en iode cationique I⁺.

L'action de la chloramine T est neutralisée par l'addition d'une solution de métabisulfite de sodium et l'iode en excès est fixé sous forme d'iodure de sodium.

La difficulté de la technique réside dans le choix du rapport chloramine / protéine. En effet, il faut obtenir un antigène avec une activité spécifique très grande, afin d'avoir une bonne sensibilité lors du dosage radio-immunologique. Une quantité trop importante de chloramine T augmente le rendement de marquage, mais elle risque aussi de dénaturer la protéine ce qui est incompatible avec son emploi ultérieur. Il a été démontré qu'une protéine modifie ses propriétés antigéniques

au-delà de 5 atomes d'iode par molécule (HUGHES et STRAESSLER 1950 (88). Ce rapport chloramine / protéine varie de 25 à 1/250 dans la technique de BOCCI (89). Il dépend de la protéine elle-même et on ne peut lui donner une valeur constante.

Par contre, le rapport chloramine T / métabisulfite de sodium qui est selon les publications compris entre 0,4 et 1,6, a une importance minime pourvu qu'il soit inférieur à 1,6 car 60 μg de métabisulfite de sodium suppriment l'effet oxydant de 100 μg de chloramine T (90).

2 - Mode opératoire

Le marquage d'une protéine comporte plusieurs temps successifs :

- le marquage proprement dit
- l'isolement de la protéine marquée
- le contrôle de cette protéine marquée

A) - Le marquage

1) Les réactifs

a) *La protéine*

L'antigène carcino-embryonnaire destiné au marquage est mis en solution à 1 mg par ml dans le tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4. Le marquage est effectué sur 10 μg de protéine soit 10 μl . La solution d'ACE est conservée congelée, par fraction de 10 μl , dans des tubes coniques en plastique munis d'un bouchon (Eppendorf Réf. 3810). Le marquage est opéré directement dans ces tubes.

b) *L'iode 125* est fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique. C'est une solution préparée spécialement pour le marquage des protéines, qui ne contient ni entraîneur, ni réducteur. La radioactivité spécifique est élevée (de 160 à 210 mCi / ml). Cet iode doit être fraîchement préparé. Théoriquement, il contient 80 à 95 % d'iode 125, ainsi que nous l'avons exposé dans les propriétés générales de l'iode 125.

La quantité utilisée pour 10 μg de protéine est de 0,7 à 1 mCi. Les volumes très faibles dus à la grande activité spécifique de l'iode 125 sont mesurés à l'aide d'une micro-seringue (Terumo).

c) *La chloramine T*

La chloramine T est pesée et dissoute dans le tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4, moins de 15 minutes avant son utilisation.

Nous avons successivement opéré nos marquages selon deux protocoles. Le premier met en jeu une quantité de chloramine importante, avec un temps de contact protéine-chloramine extrêmement court. Nous appelons ce type de marquage : type I. La quantité de chloramine T employée est : 140 μg pour 10 μg de protéine sous un volume de 10 μl .

Le deuxième protocole, par contre, se réalise avec une quantité faible de chloramine T, et un temps de contact protéine-chloramine de 1 minute 30 à 2 minutes. Nous appelons ce marquage : type II. La quantité de chloramine T est : 40 μg pour 10 μg de protéine sous un volume de 10 μl .

d) Le métabisulfite de sodium

Il est également préparé extemporanément. Pour le marquage type I : 288 μg , et type II : 30 μg , sont mis dans la réaction sous un volume de 10 μl . La dissolution est faite dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4

e) Dans le marquage type I, nous ajoutons de l'iodure de potassium comme entraîneur pour faciliter la séparation de l'iodure radioactif lors de l'isolement de la protéine marquée. (200 μl d'une solution à 1 mg/ml). Une adjonction de sérum albumine bovine à raison de 1 mg/ml est effectuée après l'isolement de la protéine marquée.

Dans le marquage type II, nous entraînons et protégeons la protéine marquée par l'addition de 800 μl d'une solution à 3 mg/ml de sérum albumine bovine.

Ces données sont résumées dans le tableau n° III.

	TYPE I	TYPE II
IODE 125	500 à 700 uCi	1 mCi environ
ACE en solution dans le tampon phosphate pH 7,4	10 µg / 10 µl	10 µg / 10 µl
Chloramine T	140 µg / 10 µl	40 µg / 10 µl
Temps de contact	10 sec.	1,30 à 2 mn
Métabisulfite de sodium	288 µg / 10 µl	30 µg / 10 µl
Iodure de potassium	200 µg / 200 µl	0
Sérum albumine bovine	après filtration 1 mg / ml	avant filtration 800 µl de sol. à 3 mg / ml

Tableau n° III
Protocole de marquage de la protéine

2) Mode opératoire

Les réactifs sont ajoutés successivement dans l'ordre de leur énumération et les précautions de manipulation nécessaires sont les suivantes :

— l'iode 125 ne doit pas être mis au contact de la protéine, mais la goutte est déposée sur les parois du tube,

— la chloramine T doit être déposée de la même façon à l'opposé de la goutte d'iode,

— le tube est alors obturé et le mélange est réalisé par agitation soit manuelle, soit à l'aide d'un agitateur Vortex,

— l'addition du métabisulfite de sodium doit se faire le plus rapidement possible afin d'éviter au maximum le départ dans l'atmosphère d'iode radioactif gazeux.

Toutes ces opérations se déroulent sous une hotte aspirante.

B) - Isolement de la protéine marquée

Après le marquage, la protéine est séparée de l'iodure radioactif libre restant en solution, et des produits éventuels de dégradation de la protéine. Ceci peut être fait par dialyse ou par chromatographie sur colonne de cellulose, sur échangeurs d'ions ou sur gel.

C'est la technique de filtration sur gel que nous avons choisie.

a) Filtration

— Colonne de Sephadex G 200

Le Sephadex G 200 est préparé dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. La colonne utilisée a un diamètre de 1 cm et une hauteur de 30 cm.

— Colonne de Sephadex G 25 fine

Pour raccourcir le temps de filtration de la protéine marquée, et compte tenu de son poids moléculaire, nous avons aussi utilisé le Sephadex G 25 "fine" et des colonnes légèrement plus petites : diamètre 0,7 cm et hauteur de 20 cm.

L'élution est faite à l'aide du même tampon phosphate. Les fractions, à la sortie de colonne sont récupérées sur un collecteur de fraction SEIVE, le volume des éluats étant déterminé par une cellule compte-gouttes en sortie de colonne. La goutte issue de la colonne tombe directement dans le tube destiné à la recueillir, en passant devant la cellule qui l'enregistre. L'avantage de ce procédé est que le liquide radioactif ne contamine aucune tubulure.

Nous avons recueilli 50 gouttes par tube dans la première série d'expériences et 10 gouttes par tube dans la seconde.

La détermination de la radioactivité des différents tubes est effectuée dans un compteur γ "Nuclear Chicago" sur une partie aliquote de 10 μ l prélevée dans chaque tube et pendant un temps court (0,2 min.) à cause de la radioactivité relativement importante de certains tubes.

Diagramme d'élution : Le schéma d'élution typique est à peu près identique pour le Sephadex G 200 et G 25 "fine", malgré le changement de gel et le fait que nous avons utilisé deux sortes de colonnes dont la hauteur et le diamètre sont différents, car nous avons compensé

les variations de volume mort par un recueil de gouttes cinq fois plus grand dans le cas de la plus grande colonne,

— les 6 à 7 premiers tubes ne contiennent aucune radioactivité,

— puis la radioactivité apparaît et augmente jusqu'à un maximum qui se situe aux environs du 11ème tube (± 1), elle diminue ensuite jusqu'au 17ème tube et reste stable pendant quelques tubes.

Ce pic est plus étroit lors de la filtration sur Sephadex G 25 "Fine".

— Il y a ensuite un second pic de radioactivité avec un maximum aux environs du 22ème tube (± 2).

Après le 30ème tube, il n'y a pratiquement plus de radioactivité.

Nous portons dans la figure n° 7 un diagramme d'élution obtenu avec chaque type de marquage.

b) Analyse des pics

Le premier pic correspond à la protéine marquée. Ce pic est parfois asymétrique, la partie montante étant plus verticale que la partie descendante. Cette dernière représente la protéine partiellement dénaturée, qui, lorsqu'elle se trouve en quantité importante peut même faire à la base du pic un renflement séparé (cf. Fig. 8).

Le deuxième pic correspond à l'iodure radioactif.

c) Mesure de rendement de marquage

$$R = \frac{\text{Radioactivité protéique}}{\text{Radioactivité totale}}$$

Connaissant la radioactivité (en cpm) de 10 μ l de la solution de chaque tube et le volume de cette solution, il est facile de calculer le pourcentage.

$$\frac{\text{Nombre de coups du pic protéique} \times 100}{\text{Nombre de coups totaux}}$$

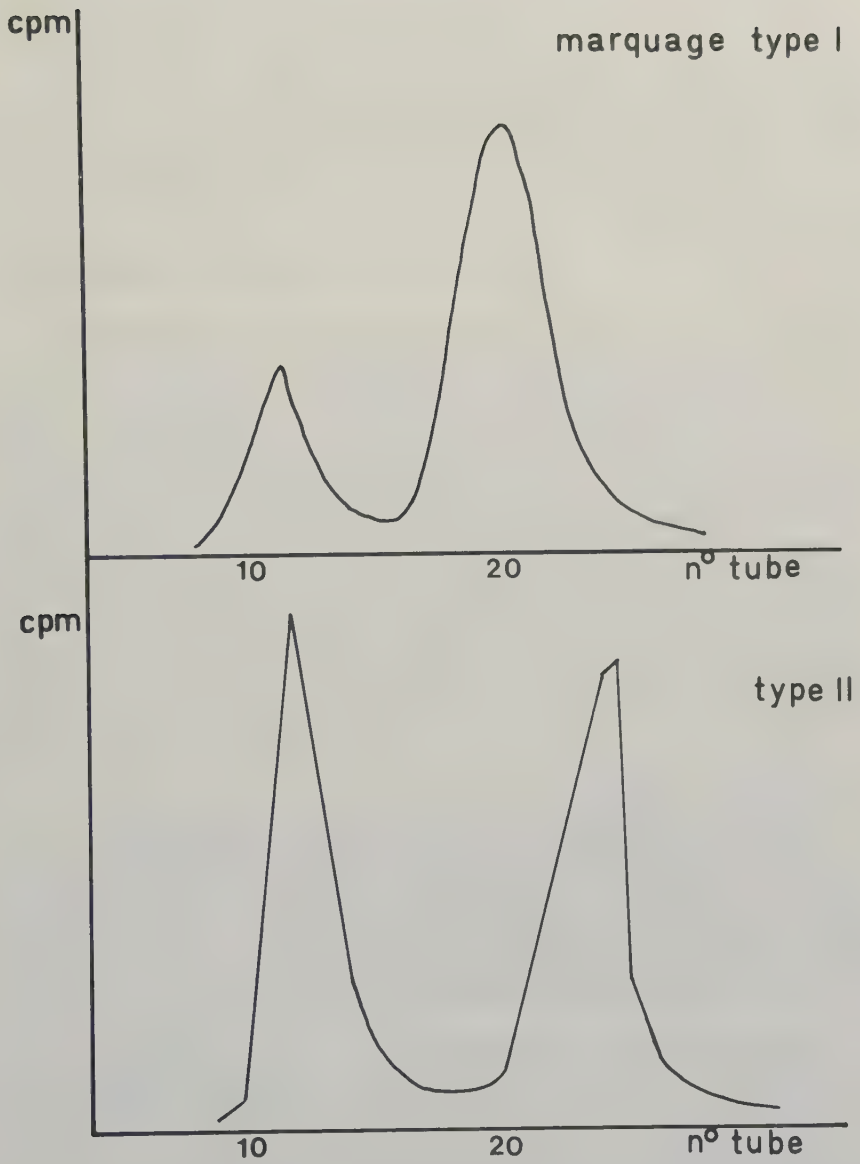


Figure n° 7

Diagramme d'élution typique de la protéine marquée

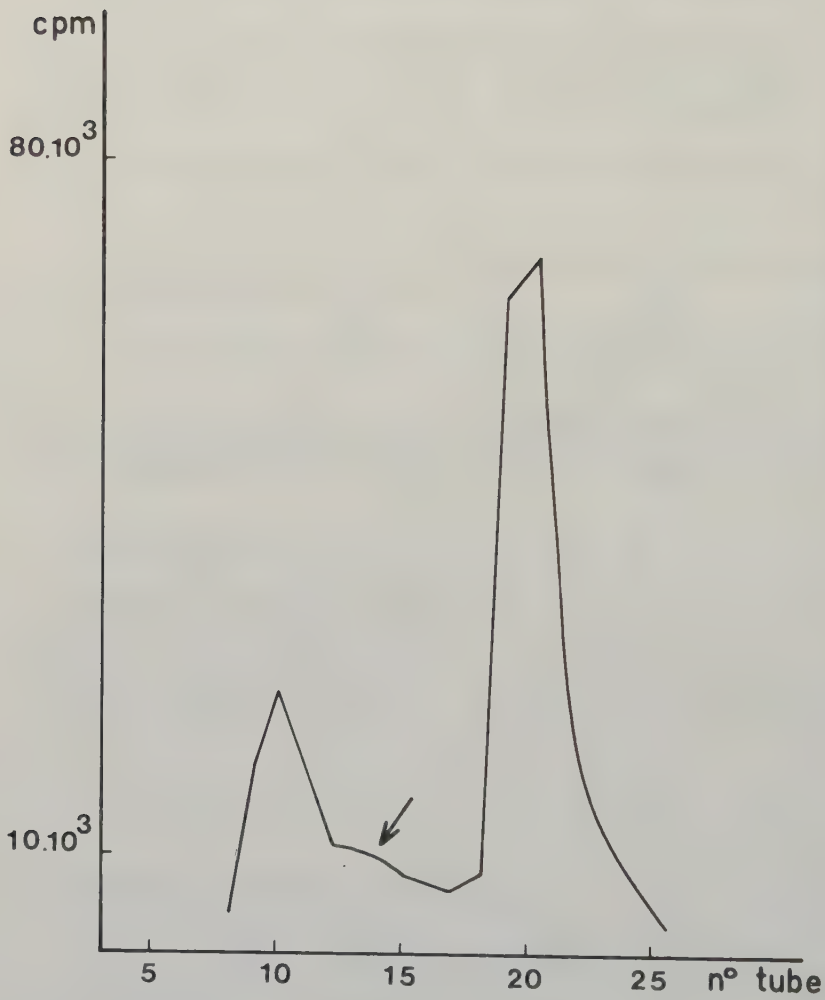


Figure n° 8
Diagramme d'élution sur Sephadex G 200
montrant un pic de protéine dénaturée

Nous avons effectué 40 marquages de l'antigène carcino-embryonnaire, 20 selon chacun des deux protocoles.

Les rendements obtenus avec le marquage type I sont en moyenne de 25 % (15 à 33 %), Pour le type II, la moyenne est de 45 % (40 à 55 %) (cf. Fig. 7). Dans ces conditions, la protéine contient de 2 à 3 atomes d'iode par molécule.

d) Sélection du tube de la protéine marquée

Pour sélectionner les tubes contenant l'antigène marqué, nous avons vérifié si l'intégrité immunologique de la protéine était respectée. En effet, un des critères de non dénaturation d'un antigène marqué, est la possibilité de précipiter complètement ou presque avec l'anticorps, quand celui-ci est en excès. Par conséquent la radioactivité du complexe formé doit être comprise entre 70 et 90 % de la radioactivité totale introduite. Un contrôle plus fin de la qualité de notre antigène peut être effectué par une méthode indirecte. Elle consiste à réaliser la courbe de dilution d'un antisérum qui s'opère en ajoutant une quantité identique d'antigène marqué à des dilutions croissantes d'antisérum. On observe à partir d'une certaine dilution une diminution progressive de la radioactivité du complexe, et on obtient une courbe caractéristique de chaque antisérum. Nous avons en général vérifié par cette méthode la protéine marquée après chaque marquage.

Bien que tous les marquages aient été en principe effectués selon le même mode opératoire, il est arrivé que la dénaturation de la protéine soit appréciable. Il nous semble important de rapporter l'un de ces marquages que nous avons étudié en détail et à partir duquel nous avons définitivement fixé les critères de sélection du tube contenant la protéine utilisable. La seule différence opératoire résidait dans la concentration de la solution de l'antigène carcino-embryonnaire 250 $\mu\text{g/ml}$ au lieu de 1 mg/ml .

Le diagramme d'élution sur colonne de Sephadex G 25 "Fine" est porté dans la figure n° 9.

La courbe de dilution effectuée avec le tube n° 8, donnait les résultats portés dans la figure n° 10. On peut voir que dès le premier tube la radioactivité du complexe était seulement de 40 % de la radioactivité totale.

En vue de récupérer l'ACE non dénaturé, nous avons mélangé les tubes 7, 8, 9 et 10, qui forment le pic de protéine et nous les avons

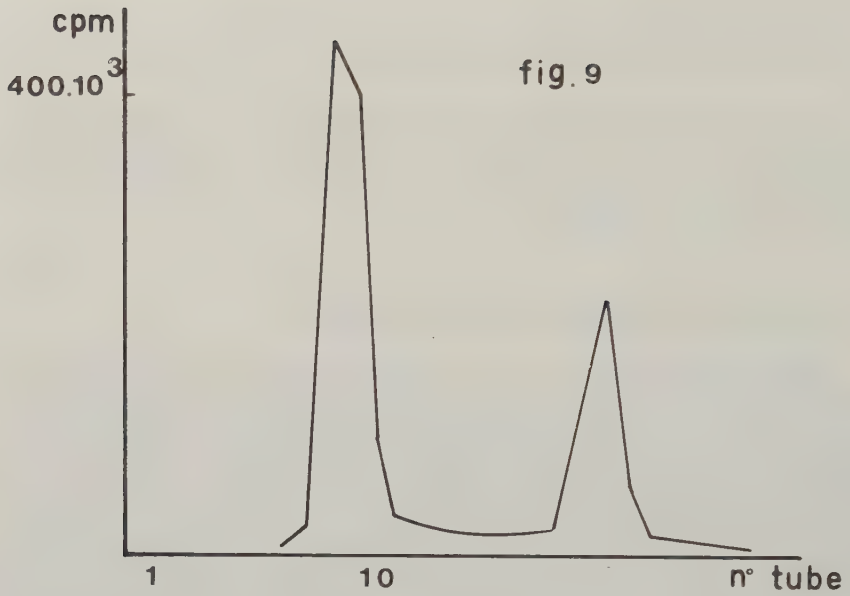


Figure n° 9
Diagramme d'élution apparemment normal

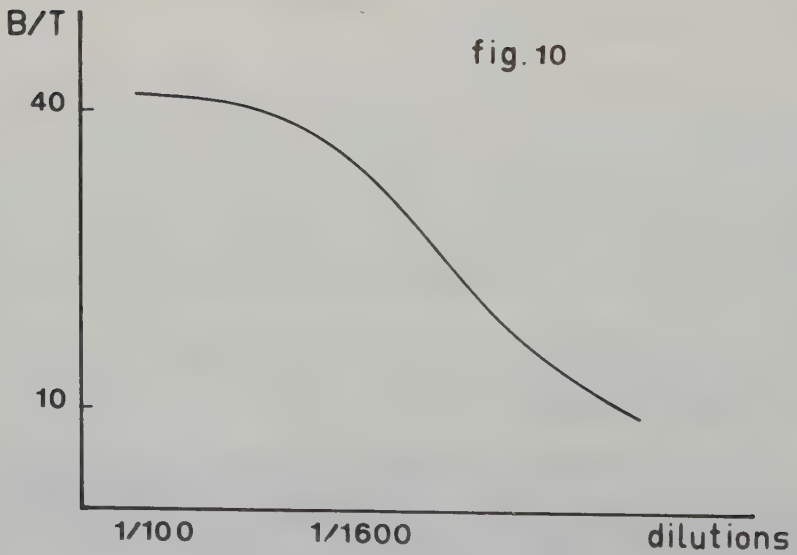


Figure n° 10
Courbe de dilution obtenue avec le tube n° 8 de l'éluat

filtrés de nouveau sur colonne de Sephadex G 200 (Figure n° 11). La protéine dénaturée semble apparaître dès le tube n° 14, faisant d'abord un renflement, puis un pic distinct dans les tubes 23 à 30. Nous avons alors vérifié les tubes n° 10, 12 et 15, qui se trouvent respectivement au milieu de la partie ascendante, au sommet, et au début de la pente descendante du pic. De l'examen de ces courbes, il ressort que seul le tube n° 10 contenait une protéine intacte puisqu'il donnait une fixation de 80 %, le tube n° 12 n'ayant déjà plus que 55 % de fixation, et le tube n° 15 à peine 19 %. Ces résultats sont reportés dans le tableau n° IV.

Cette expérience nous a incitée à utiliser par sécurité les seuls tubes de la partie montante du pic et non pas le tube ayant la radioactivité maximale. Nous devons préciser ici que les tubes sélectionnés ont la haute radioactivité nécessaire aux dosages et qui est suffisante pour faire tous les essais voulus pendant le temps de validité de la protéine que nous allons maintenant envisager.

DILUTIONS DE L'ANTISERUM	B / T en %		
	Tube n° 10	Tube n° 12	Tube n° 15
1/200	80,7	54,7	18,7
1/400	78,5	54,7	19,5
1/800	76	52,2	17,9
1/1600	71	50	16,1
1/3200	67,5	44,5	13,4
1/6400	56,2	40	11,5
1/12800	48	29,4	9,2
1/25600	34,5	22,2	8,5
1/51200	22,8	15,5	5,4

Tableau IV
Courbes de dilution de l'antisérum
réalisées avec trois fractions d'élution d'ACE*

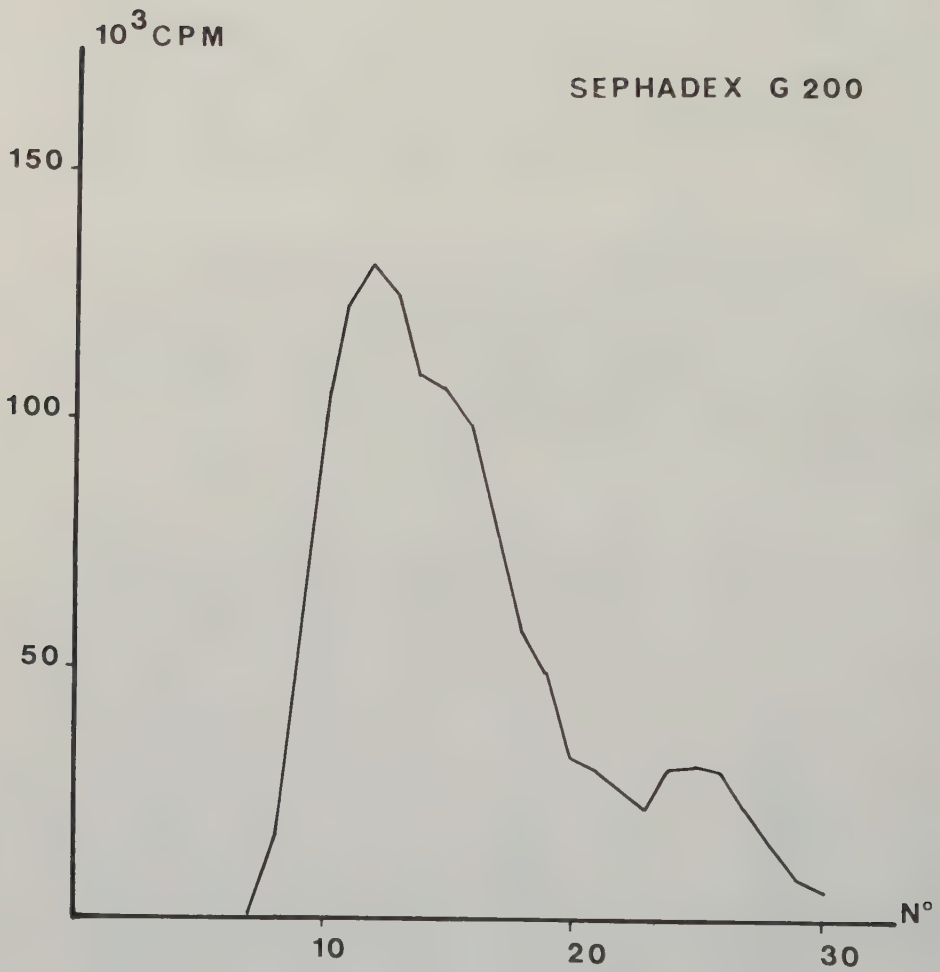


Figure n° 11
Diagramme de la deuxième élution nécessaire
par la dénaturation de la protéine

C) - Contrôle de stabilité de l'antigène marqué

Les éluats contenant l'antigène marqué sont conservés non dilués à +4°.

Le contrôle de désiodation de la molécule est effectué par chromatographie en couche mince, sur plaque d'acétate de cellulose Merck.

La migration se fait dans le tampon suivant :

Acétate d'ammonium à 10 p 100	1 volume
Méthanol	1 volume

pendant 5 à 6 heures à la température du laboratoire. La distance parcourue alors par le solvant est d'environ 12 à 16 cm.

Après la migration, la plaque est découpée parallèlement au front du solvant, en bandes d'une largeur de 1 cm à partir de 1 cm en dessous du point de départ.

Chaque fragment est compté séparément dans le cristal puits.

Un échantillon d'Iode 125 est déposé comme témoin sur la même plaque, et compté dans les mêmes conditions.

Les pourcentages respectifs de la protéine marquée et de l'Iode libre sont calculés.

Résultats -

La protéine reste sur la ligne de départ, alors que l'Iode migre avec le front du solvant.

Ce contrôle est effectué le jour du marquage et environ chaque semaine par la suite.

Les résultats sont les suivants : malgré la séparation sur colonne, le premier jour, la quantité d'Iode libre est de 5 à 8 %. Huit jours après le marquage, le pourcentage est de 10 à 15 %, pour atteindre 45 %, 30 jours après (cf. Figure 12).

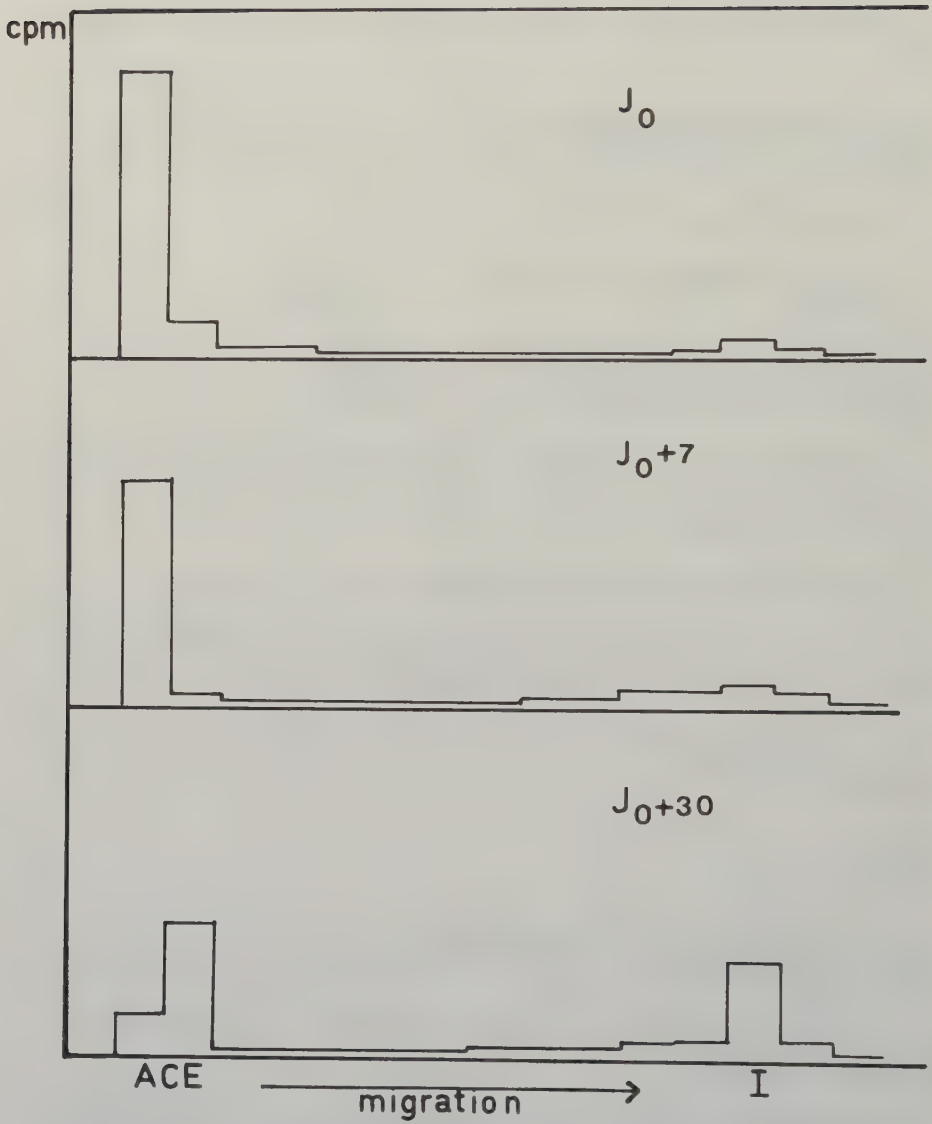


Figure n° 12

Etude chromatographique de la désiodation de l'ACE*
en fonction du temps

DISCUSSION

Nous avons, dans un premier temps mis au point le marquage de la protéine selon un protocole que nous avons appelé type I. Nous pensions alors qu'une protéine avait moins de chance d'être dénaturée pendant le marquage si le temps d'oxydation était court et la chloramine T en quantité moyenne. Nous avons pourtant essayé un second type de marquage (type II) dans lequel avec une faible quantité de chloramine T, le temps de contact était long.

Avec les deux techniques, nous avons obtenu une protéine marquée de bonne immunoréactivité, la combinaison de l'antigène marqué avec les anticorps en excès variant de 70 à 80 %.

Le marquage type I conférant à la protéine une radioactivité spécifique plus basse (rendement de marquage 25 % contre 45 % pour le type II), nous avons adopté le marquage type II.

Après plusieurs essais comparatifs, nous avons décidé d'isoler la protéine marquée par filtration sur Sephadex G 25 "fine" à cause de sa rapidité, bien que la méthode soit moins rigoureuse que sur le Séphadex G 200. En effet sur les éluions provenant d'une colonne de Séphadex G 200 nous pouvons éventuellement individualiser un pic contenant la protéine dénaturée, ce qui n'est pas possible sur les effluents d'une colonne de Séphadex G 25 "Fine".

Nous nous assurons de la qualité de la protéine marquée par le choix strict du tube dans la portion ascendante du pic, et par le contrôle de son immunoréactivité, ainsi que nous l'avons décrit. Nous avons ainsi une protéine qui possède une grande activité spécifique souhaitable pour son utilisation en dosage radio immunologique, et en quantité suffisante pour l'employer pendant deux semaines.

L'examen attentif de nos échecs nous a conduit à insister sur divers points de la technique, à savoir :

- la concentration de la solution de l'ACE

- le schéma du déroulement des manipulations sur lequel nous avons déjà insisté. Ainsi, un marquage a donné des résultats médiocres parce qu'un retard dans l'addition de la chloramine T a fait que l'iode 125 a été seul en contact avec la protéine un temps relativement long.

Lors d'un marquage sur une quantité de protéine inférieure à 10 μg (5 μg dans 5 μl), l'immunoréactivité obtenue fut nulle. Nous ne

sommes pas certains d'y voir la raison de l'échec car un autre facteur aurait pu entrer en jeu, en effet la quantité d'iode radioactif était beaucoup plus importante que prévue. Par sécurité, nous avons maintenu nos marquages sur 10 μg et sans jamais utiliser plus de 1 mCi d'iode 125.

Enfin pour éviter l'écueil d'une désiodation trop importante, nous n'utilisons la protéine marquée que pendant deux semaines. Ceci nécessite un nombre de marquages importants de la protéine, mais une purification par nouveau passage sur colonne de Séphadex pour séparer l'iode libre, ne nous a pas semblé présenter beaucoup d'intérêt. Nous avons procédé à quelques essais dans ce sens, la protéine obtenue est relativement diluée et le temps gagné par rapport à un nouveau marquage est peu important.

C — L'ANTISERUM

1 - Préparation

Les antisérums anti ACE ont été préparés sur deux espèces animales : le lapin et le mouton.

a) Antisérum de lapin

Le matériel antigénique obtenu comme nous l'avons décrit précédemment, est injecté dans le coussinet plantaire du lapin à la dose de 100 μg sous un volume de 1 ml avec l'adjuvant complet de Freund. On procède en général à trois injections de rappel, composées chacune de 0,5 ml d'une solution d'ACE à 100 μg dans 1,5 ml de soluté de chlorure de sodium à 9 g pour mille et de 0,5 ml d'une solution d'alun d'ammonium à 1 g pour cent. La première injection est sous-cutanée, les deux autres intra-veineuses.

Une saignée à blanc par canulation de la carotide, est effectuée 5 à 8 jours après le dernier rappel, si la quantité d'anticorps est suffisante, ce que l'on vérifie d'abord ; sinon on procède à de nouveaux rappels, une semaine après.

Le sérum obtenu est filtré sur filtre millipore.

b) Antisérums de mouton

L'immunisation des moutons est réalisée de façon très voisine. Les doses sont injectées par voie intra-musculaire et les rappels sont plus nombreux. Il n'est pas fait ici de saignée à blanc, mais des saignées importantes fournissant des lots avec lesquels il est possible de faire de nombreux dosages et dont le taux en anticorps n'est pas toujours identique. La première injection est faite avec 250 μ g d'ACE additionnés de l'adjuvant complet de Freund. On commence les injections de rappel un mois après, trois jours de suite, par voie intramusculaire, chaque injection contenant 100 μ g d'antigène dissout dans une solution d'alun d'ammonium à 1 g pour cent. La deuxième série est effectuée avec les mêmes doses quinze jours après et la troisième série, deux mois plus tard à raison de 50 μ g par injection.

Tous les antisérums sont conservés congelés et conditionnés sous un petit volume, chaque fraction n'étant décongelée qu'une seule fois.

Le schéma de l'immunisation figure dans le tableau n° V.

2 - Contrôle des antisérums

Ils consistent à vérifier la spécificité des antisérums vis-à-vis de l'antigène injecté. On utilise plusieurs méthodes et en particulier :

- la réaction de double diffusion selon Ouchterlony en agarose à une concentration finale de 1,5 % dans une solution de chlorure de sodium à 9 g par litre,

- une immunoélectrophorèse en milieu gélifié (agarose à une concentration de 1 % en tampon véronal 0,05 M de pH 8,2).

L'existence de réactions croisées données par certains antisérums avec d'autres antigènes que l'ACE, nous a amenée à les épuiser par les tissus contenant les antigènes donnant ces réactions. Dans notre cas, il s'agit le plus souvent de réactions croisées avec le NCA. On élimine les anticorps anti NCA présents dans les antisérums anti ACE, par épuisement avec un extrait perchlorique semi purifié de poumon humain normal, la quantité d'extrait variant avec l'antisérum. Le contact maintenu 1 heure à 37° C et 1 heure à + 4° C, est suivi d'une centrifugation. Pour les mêmes raisons, si besoin est, l'antisérum est épuisé par du plasma humain normal (30 mg/ml), par contact 2 heures à 37° C, puis 24 heures à + 4° C.

	JOUR	QUANTITE d'ACE	ADJUVANT	VOIE
LAPIN	1	100 μ g	FREUND	Intra-cutanée
	15 - 22	100 μ g	Alun d'ammonium	Sous-cutanée I.V.
	16 - 23			
	17 - 24			
	22 ou 29	Saignée de contrôle		
23 ou 30	Saignée à blanc			
MOUTON	1	250 μ g	FREUND	I.M.
	30	100 μ g	Alun d'ammonium	I.M.
	31	100 μ g		
	32	100 μ g		
		Saignée A		
	45	100 μ g	Alun d'ammonium	I.M.
	46	100 μ g		
	47	100 μ g		
		Saignée B		
	105	50 μ g	Alun d'ammonium	I.M.
	106	50 μ g		
	107	50 μ g		
		Saignée C		

Tableau n° V

Schéma d'immunisation comparatif
du lapin et du mouton

Ces épuisements se font au moment de l'emploi de l'antisérum.

3 - Titrage des antisérums

Nous avons établi une courbe de dilution pour chacun d'entre eux. Toutes les courbes sont réalisées selon un schéma identique : à une même quantité d'antigène marqué à l'iode 125, nous ajoutons sous un même volume des dilutions croissantes d'antisérum.

Rappelons que l'antigène marqué se combine aux anticorps en donnant un complexe antigène * -- anticorps, dont la radioactivité est fonction de la quantité d'anticorps mise en jeu. Le rapport B/T est élevé (70 à 90 %) lorsque les anticorps sont en excès, et il diminue avec la dilution de l'antisérum pour devenir presque nul. En portant en ordonnée le pourcentage B/T, et en abscisse logarithmique, les dilutions de l'antisérum, on obtient une courbe caractéristique d'un antisérum donné dans des conditions opératoires définies.

La réalisation de la courbe de dilution comporte deux temps :

a) Incubation

Les antisérums dilués dans le tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4, sont mis en contact pendant 24 à 36 heures à + 4°C, avec l'antigène marqué dilué dans le même tampon. Les antisérums ont au départ une dilution de 1/50 ou 1/100, et les suivantes varient entre elles d'un facteur deux. La radioactivité introduite donne 12.000 à 20.000 cpm dans les conditions de réglage du compteur γ . Des essais d'incubation de 15 à 18 heures à 37°C pendant la nuit ont donné les mêmes résultats, et le gain de temps est négligeable. Par ailleurs l'augmentation du temps de contact (48 heures) n'apporte rien de plus.

Le milieu de réaction doit avoir une teneur protéique suffisante, elle est assurée par du sérum humain normal ou son extrait perchlorique.

Chaque courbe est accompagnée d'un témoin composé d'antigène marqué et de tampon, sans antisérum ; ceci permet lors de l'isolement du complexe marqué, de chiffrer l'entraînement parasite de l'antigène radioactif.

*b) Séparation du complexe antigène * -- anticorps*

L'isolement du complexe formé est un point très important aussi

bien pour le titrage des antisérums, que pour la réalisation des courbes d'inhibition, car il est capital de déterminer avec le plus de précision possible les pourcentages respectifs d'antigène marqué libre et lié, ou ainsi que nous le faisons, le pourcentage d'antigène marqué lié, par rapport à la radioactivité totale, qui est déterminée immédiatement, avant l'incubation.

Les différentes techniques de séparation du complexe se répartissent en trois groupes :

- 1) Adsorption de l'antigène libre sur différents supports :
 - papier (chromatographie ou chromato-électrophorèse
 - charbon activé
 - talc
 - silicate
- 2) Précipitation du complexe par :
 - utilisation d'un antisérum rendu insoluble par sa polymérisation ou son couplage à des polymères insolubles,
 - des solutions salines précipitant les globulines,
 - l'alcool ou l'acétone
 - des anticorps anti γ globulines de l'antisérum (double anticorps).
- 3) Filtration sur gel.

Une des méthodes, couramment utilisée parmi les méthodes d'adsorption est la chromatographie électrophorétique introduite par BERTSON et coll. (1956) (91), dans laquelle certains antigènes sont fortement adsorbés sur le papier électrophorétique tandis que l'antigène lié aux anticorps, migre avec les globulines sériques. Après la séparation, la distribution de la radioactivité est déterminée par "scanning" ou par comptage des bandes de papier découpées. Un avantage de cette technique est de pouvoir également doser l'iode libre éventuel car il migre en avant de l'antigène lié.

La résine échangeuse d'anion AMBERLITE CG-400 qui retient l'antigène libre a été employée par MEADE et KLITGAARD (92) en 1962 dans un dosage de l'insuline, et par MELANI (93) (1966) pour la séparation de la corticotropine.

Le charbon activé a été utilisé d'abord seul par HERBERT et coll. (1965) (94), puis saturé avec des protéines plasmatiques ou du dextran d'un poids moléculaire de 10.000 à 250.000, ce qui permet d'adsorber les substances de poids moléculaire inférieur.

ROSSELIN et coll. (1966) (95), utilisent le talc.

Dans le deuxième groupe de méthodes, la précipitation par des solutions salines, de l'alcool ou de l'acétone, a été employée par GRODSKY et FORSHAM (1960) (96) et HEDING (1966) (97).

Dans la technique où l'anticorps est couplé à une matière insoluble, cette dernière est soit du dextran, soit du polyacrylamide (Sépharose), soit un copolymère synthétique de styrène et de tétra fluoroéthylène (CATT et coll., 1966) (98), soit simplement des tubes de polystyrène (CATT et TREGAR 1968) (99).

La technique du double anticorps a été développée par HALES et RANDLE (1963) (100), et MORGAN et LAZAROW (1963) (101), selon le rapport de SKOM et TALMAGE (1958) (102), sur la possibilité de précipiter le complexe soluble antigène-anticorps de l'insuline avec une anti γ globuline dirigée contre l'animal ayant fourni le sérum anti-insuline. Après précipitation, la séparation est effectuée par filtration (HALES et RANDLE) (103) ou par centrifugation et décantation (MORGAN et LAZAROW) (104).

Enfin, HARBER et coll. (1965) (105) et HUNTER et GREENWOOD (1964) (106) emploient la filtration sur gel.

La technique idéale de séparation serait celle qui, adaptable facilement à tous les systèmes séparerait l'antigène libre de celui lié à l'anticorps complètement et rapidement. La grande abondance des techniques prouve que ceci n'existe pas (107).

Nous avons essayé quatre techniques pour séparer le complexe ACE *-anticorps.

Technique au charbon-dextran

Cette technique est une technique d'adsorption de l'antigène marqué libre. Le polymère synthétique du glucose, dont le poids moléculaire peut varier de 10.000 à 250.000, forme autour du charbon une matrice, qui permet seulement aux particules de plus faible poids moléculaire de pouvoir être adsorbées.

On ajoute à chaque tube un même volume (ici 0,7 ml) d'une suspension de charbon-dextran en tampon véronal de pH 7,4. Cette suspension est soit préparée extemporanément en mélangeant à parties égales et sous agitation, une solution de dextran (P.M. 200.000) à 5 g

par litre, à une suspension de charbon (noir Norit) à 50 g par litre, soit, si le mélange a été effectué depuis un certain temps et conservé à $+4^{\circ}\text{C}$, en homogénéisant soigneusement avant l'emploi.

Chaque tube est agité par retournement pendant 15 secondes, puis centrifugé pendant 5 minutes à 3000 tours par minute (centrifugeuse Jouan). Après décantation du surnageant, le culot de centrifugation est compté en scintillation γ . Pour chaque tube, on calcule le pourcentage de la radioactivité liée par rapport à la radioactivité totale.

Nos essais ont porté sur le titrage d'antisérums de lapins.

Résultats

Seules, les courbes de dilution effectuées en milieu tampon ont donné des résultats cohérents. Nous rapportons pour mémoire les résultats obtenus dans ces conditions, dans le tableau n° VI.

Dilutions de l'Antisérum	% B/T	
	1er essai	2ème essai
1/25	65	71
1/50	65	66
1/100	56	61
1/200	48	53
1/400	46	46
1/800	40	38,5
T	10	10

Tableau n° VI

Courbe de dilution avec séparation du complexe
par la technique au charbon-Dextran (en milieu tampon)

En présence de sérum humain ou de son extrait perchlorique, les résultats ont toujours été décevants. La radioactivité adsorbée est toujours très faible, de l'ordre de 30 %, même pour les grandes dilutions d'antisérum où elle devrait atteindre 90 % environ.

Ceci est probablement dû au fait que en milieu fortement protéique, il y a saturation rapide du charbon. Nous n'avons pas obtenu d'amélioration de nos résultats en augmentant le volume de réactif jusqu'à 2 ml. Ce mode de séparation n'est pas applicable aux dosages sériques de l'ACE, et, malgré sa rapidité et sa facilité d'exécution, nous ne l'avons pas utilisé pour ce travail, même lorsque nous avons mis en évidence l'ACE dans des solutions de faible teneur protéique.

Technique utilisant un antisérum polymérisé

Afin d'insolubiliser le complexe antigène-anticorps immédiatement, nous avons essayé d'utiliser notre antisérum anti ACE polymérisé par la glutaraldéhyde selon la technique d'AVRAMEAS et TERNYNCK (108). Cette méthode conduit à l'obtention d'une masse gélatineuse que l'on doit fragmenter finement et homogénéiser le plus soigneusement possible dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. Compte tenu du volume d'antisérum traité et du volume de suspension obtenu, on calcule la dilution subie par l'antisérum, pour effectuer avec une précision suffisante la dilution au 1/50 qui correspond au premier tube de la courbe de dilution.

L'incubation est effectuée sous agitation pendant 1 heure à la température du laboratoire, et repos 24 heures à + 4°C.

Une simple centrifugation de 20 minutes à 3000 tours/min (centrifugeuse Jouan) permet d'obtenir un culot formé par le complexe antigène marqué-anticorps, que l'on compte en scintillation γ .

Résultats

Les résultats obtenus pour chaque antisérum, respectent la décroissance du rapport B/T avec la dilution de l'antisérum, mais les chiffres sont légèrement plus faibles que ceux des autres techniques étudiées, et la reproductibilité est imparfaite. Nous exposons dans le tableau n° VII deux essais en double d'une courbe de dilution de sérum de lapin.

Dilutions de l'Antisérum	% B/T	
	1er essai	2ème essai
1/100	53	50,5
1/200	57	51
1/400	43	40,5
1/800	31,5	28
1/1.600	21,5	17,5
1/3.200	16	13,5

Tableau n° VII
Courbes de dilution avec séparation du complexe
par polymérisation de l'antisérum

Cette méthode est séduisante au premier abord, car elle utilise les deux réactifs strictement nécessaires, l'antigène et son antisérum.

Nous nous sommes heurtée cependant à des difficultés pratiques importantes. La première, est que pour polymériser un antisérum, on doit disposer de volumes importants, ce qui n'est pas toujours possible. La deuxième réside dans le fait que le polymère est difficile à fragmenter finement et régulièrement, et de ce fait, il est délicat d'obtenir des suspensions homogènes faciles à pipetter de façon reproductible. Néanmoins ces problèmes techniques devraient pouvoir être résolus puisque quelques publications exposent le dosage des oestrogènes, de la LH et des FSH avec ce mode de séparation (109). N'ayant pas à notre disposition un homogénéiseur suffisamment efficace, nous avons renoncé à ce procédé.

Technique de précipitation par le sulfate d'ammonium

Elle est classique de l'isolement des globulines. Le complexe antigène anticorps étant précipité, se trouve dans le culot de centrifugation (110).

Les γ globulines sont précipitées par des solutions de sulfate d'ammonium dont la concentration finale varie de 33 à 50 % de saturation.

Nous avons réalisé deux séries d'essais, l'une avec une concentration finale de 45 %, l'autre de 50 %, concentrations obtenues par l'addition en quantité calculée d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (750 g par litre).

Après une agitation de 5 secondes à l'agitateur Vortex et une attente de 1 heure à $+4^{\circ}\text{C}$, les différents tubes sont centrifugés à 5000 tours/minute pendant 20 minutes (centrifugeuse JOUAN).

Le culot de centrifugation est lavé par des solutions de sulfate d'ammonium, respectivement à 45 et 50 % de saturation. Après une seconde centrifugation, les surnageants sont éliminés et les parois internes des tubes essuyés soigneusement afin d'éliminer toute trace de liquide.

Les tubes sont alors de nouveau comptés en scintillation γ .

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau n° VIII. Rappelons que le témoin qui accompagne chaque courbe de dilution a pour but de montrer la part réellement imputable à la liaison antigène marqué-anticorps, et celle qui revient à un phénomène physique secondaire qui peut être une adsorption, ou un entraînement par coprécipitation.

La radioactivité importante des témoins de précipitation, comparée à celle des différents points de la courbe, nous amène à quelques remarques : nos courbes de dilution ont été effectuées en présence de sérum humain normal afin de respecter les conditions d'un dosage sérique d'ACE, et dans ces conditions le précipité de globulines formé est important. Le risque d'entraînement de l'antigène marqué dans le précipité en est donc d'autant plus élevé, et c'est pourquoi la radioactivité des témoins varie de 20 à 35 %, parfois même 40 % de la radioactivité initiale. Il est de ce fait difficile de chiffrer la radioactivité propre au complexe Antigène* Anticorps aux différentes dilutions d'anti-sérum.

Dilution de l'antisérum	SO ₄ (NH ₄) ² 45% sat. B/T %		SO ₄ (NH ₄) ² 50 % sat. BT %	
	1er essai	2ème essai	1er essai	2ème essai
1/25	89	90	96,5	95
1/50	86	87,7	93,5	92
1/100	85	83	90,5	90
1/200	81,5	82	84,5	84
1/400	76,5	76,2	79,2	78
1/800	66,5	63	67,2	66
1/1600	59	60	62,5	61,5
1/3200	47	48,2	48,5	47
1/6400	41	41,5	43,7	42,5
1/12800	39	38,4	41	40,5
Témoin	35 %		39,8 %	

Tableau n° VIII

**Courbes de dilution avec séparation du complexe
par précipitation au sulfate d'ammonium**

Au cours de l'inhibition par l'antigène froid de la réaction anti-gène marqué-anticorps, la dilution à choisir de l'antisérum est très importante ; elle doit donner dans les conditions opératoires un rapport B/T voisin de 50 %, connu avec une précision suffisante afin de pouvoir en apprécier la diminution, même si elle est légère, lorsque l'antigène marqué et non marqué entrent en compétition.

Or, ici il apparaît :

— que la pente de la courbe de dilution de l'antisérum considéré est faible,

— que le rapport B/T voisin de 50 % est donné pour la dilution 1/3200 environ qui représente l'avant dernier tube de la série ayant une radioactivité chiffrée peu supérieure au témoin. Ceci est incompatible avec la courbe de dilution typique d'un antisérum. Il nous a semblé logique de penser que l' "adsorption" de la radioactivité mesurée dans les tubes témoins devait se retrouver dans tous les autres tubes, surajoutés à la valeur réelle du complexe antigène*-anticorps.

C'est pourquoi nous avons été amenée à tenir compte dans le mode d'expression des résultats du taux de précipitation des témoins. Nous appellerons le B/T calculé dans les conditions ci-après : B/T "corrigé", par opposition au B/T découlant des chiffres de comptage bruts.

Nous donnons dans le tableau n° IX les résultats obtenus pour une courbe de dilution, avant et après correction des chiffres par rapport aux témoins.

Nous avons été forcée de rapporter tous nos résultats à une radioactivité totale moyenne, calculée d'après l'ensemble des valeurs obtenues par la mesure de la radioactivité dans chaque tube avant précipitation : soit 22.500 cpm. Il en résulte une correction légère de chiffre de radioactivité trouvée dans chaque précipité. C'est après cette correction que nous avons recalculé le rapport B/T, en tenant compte des témoins, d'où un rapport corrigé qui figure à la dernière colonne du tableau IX. Pour la dilution au 1/25 on aura ainsi : 20400 (= B) et 21100 (= T)

$$\frac{20400 \text{ cpm (Ius)} \times 22500}{21100 \text{ (Ius)}} = 21700 \text{ cpm}$$

qui correspondent donc à la valeur B quand T est égal à 22500 cpm.

Pour les tubes témoins on a : en moyenne 9400 cpm pour B, et 23800 cpm pour T, ce qui donne après correction du nombre de comptage de départ :

$$\frac{9400 \times 22500}{23800} = 8900 \text{ cpm}$$

que nous considérons comme surajoutés au comptage de chaque tube, et nous avons alors pour la dilution au 1/25 :

$$\frac{21700 - 8900}{22500 - 8900} = \frac{12800}{13600} = 94 \% = \text{B/T "corrigé"}$$

Dilutions antisérum	Cpm Totaux (T)	Cpm du précipité (B)	%B/T (brut)	Cpm précipité rapporté à T identique	Correction en fonction du témoin	%B/T (corrigé)
1/25	21 100	20 400	96,5	21 700	21700-8900	94
1/50	22 500	21 100	93,5	21 100	22500-8900	90
1/100	23 570	22 150	93,5	21 100		90
1/200	23 350	19 685	84,5	19 000		74,5
1/400	22 950	18 180	79,2	17 850		66
1/800	22 300	14 980	67,2	15 100		45,5
1/1600	20 000	12 520	62,5	14 000		37,5
1/3200	22 350	10 540	48,5	10 950		15,1
1/6400	22 370	9 780	43,7	9 850		7
Témoins	25 750	9 650	37,5	8 900		
	23 520	9 800	41,7	(moyenne)		
	22 285	8 750	39,3			
	22 900	9 400	41			

Tableau n° IX

Courbe de dilution obtenue par précipitation au sulfate d'ammonium, avec et sans correction par rapport au témoin.

Si nous portons sur la même figure, la représentation graphique de la courbe de dilution, selon ses deux modes d'expression (figure n° 13), il apparait alors que la pente de l'antisérum étudié descend jusqu'à 7 % avec une grande dilution, ce qui n'était pas mis en évidence précédemment ; ainsi le choix de la dilution appropriée pour réaliser les courbes d'inhibition et les dosages, devient aisée.

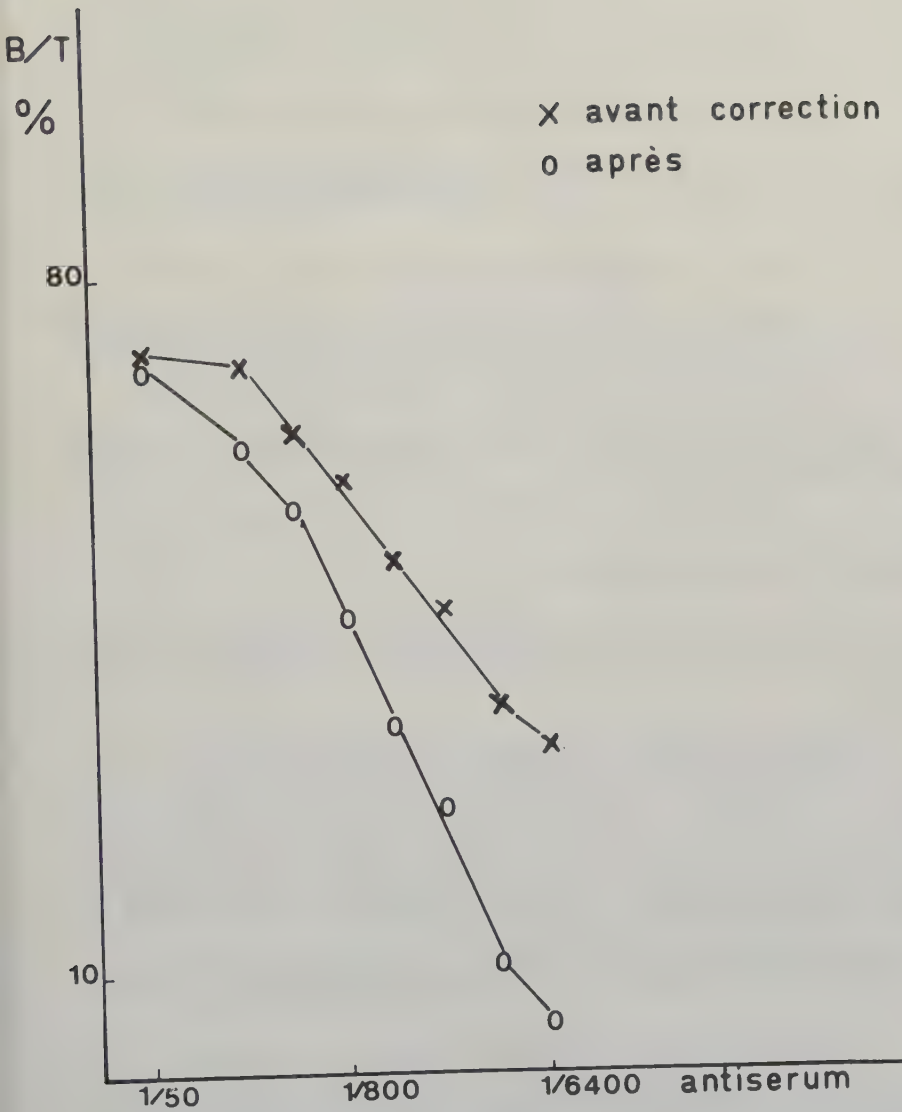


Figure n° 13
Courbes de dilution avec isolement du complexe
par le sulfate d'ammonium

Les courbes de précipitation du complexe antigène-anticorps par les deux concentrations de sulfate d'ammonium, ne sont pas très différentes l'une de l'autre. La concentration à 50 % de saturation est plus facile à obtenir, puisqu'il suffit de mesurer un volume de solution saturée égal à celui du volume total de l'incubat. C'est ce que nous avons adopté dans tous les dosages suivant ce mode de séparation.

Cette technique a l'avantage d'être simple, elle ne met en jeu qu'un réactif, et elle est rapide, le temps d'isolement du complexe ne dépassant pas trois heures.

La radioactivité retrouvée dans les témoins, entraîne des corrections de calcul qu'une expérimentation rigoureuse rend nécessaires. Il est également souhaitable de faire un témoin sur chacun des sérums dosés.

Malgré tout, cette technique reste facilement applicable à tous les dosages d'ACE.

Technique du double anticorps

C'est une technique de précipitation par un antisérum dirigé contre les γ globulines de l'animal utilisé pour produire l'antisérum spécifique anti ACE.

Elle consiste à ajouter un deuxième antisérum précipitant le premier, il se produit alors une double réaction antigène-anticorps, ce qui augmente les causes d'erreur au cours de l'analyse. Le deuxième antisérum ne doit pas perturber la liaison entre l'antigène carcinoembryonnaire et son antisérum, et il doit précipiter totalement le complexe formé aux concentrations employées dans l'analyse.

Les antisérums précipitants utilisés ont deux origines : ce sont,

- soit des antisérums du commerce,

- soit des antisérums préparés par nous, selon le mode d'immunisation classique, avec des γ globulines de lapin ou du mouton puisque nos antisérums anti ACE sont obtenus sur ces deux espèces animales.

Nous avons suivi la technique de post précipitation dans laquelle le deuxième anticorps précipite le complexe antigène-anticorps déjà formé préalablement ; la technique de préprécipitation consistant à insolubiliser l'antisérum avant la mise en jeu de la réaction.

Le point important de cette méthode est de déterminer :

- la quantité du deuxième anticorps nécessaire pour précipiter tout le complexe, et
- le temps d'incubation requis pour obtenir ce résultat.

Le protocole est le suivant :

A - Précipitation du sérum anti ACE préparé sur le lapin

a) Détermination de la quantité nécessaire de deuxième anticorps.

Nous utilisons le sérum anti ACE à la dilution qui selon les autres modes d'isolement du complexe antigène anticorps, donne environ 50 % de précipitation. Cette dilution est effectuée dans un tampon phosphate nommé PBS 0,1 M en phosphate disodique et 0,05 M en phosphate monosodique, de pH 7,5.

A un milieu d'un volume de 200 μ l constitué :

- par le tampon PBS contenant 1 mg/ml de sérum albumine bovine (SAB)
- ou par ce tampon PBS contenant 1 mg/ml de γ globulines de l'animal ayant fourni le sérum anti ACE (lapin)
- ou par du sérum humain normal,

on ajoute des quantités fixes :

- d'antigène marqué (10 μ l d'une dilution en tampon PBS contenant environ 20.000 cpm),
- d'antisérum anti ACE : 50 μ l

et des quantités croissantes de 10 à 90 ou 100 μ l de deuxième antisérum (cf. tableau n° X).

Le temps d'incubation est constant : 24 heures à + 4° C.

Remarques

— Les variations opérées dans la composition du milieu ont pour but de vérifier que la précipitation du complexe est partout identique.

— L'addition des γ globulines ou du sérum de l'animal fournissant le premier anticorps est destinée à favoriser la précipitation et la séparation du précipité grâce à l'augmentation de la quantité de protéines qui, sans cela, se trouvent à une concentration basse à cause de la relativement grande dilution du premier antisérum. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° XI.

Il apparaît que :

— le milieu contenant des γ globulines de lapin demande une quantité trop importante de sérum de mouton anti γ globulines de lapin, puisqu'avec 90 μ l nous n'atteignons pas un maximum de précipitation,

— en tampon PBS SAB, dès 40 μ l, la précipitation augmente assez peu, et il est possible de considérer que nous avons affaire à un plateau (cf. figure n° 14),

— en milieu de sérum humain normal, la précipitation est anarchique.

L'examen des résultats de la précipitation en milieu PBS SAB nous a amenée à choisir une quantité de 50 μ l de deuxième antisérum puisque cette quantité provoque avec une marge de sécurité de 10 μ l la précipitation maxima du complexe.

La réalisation d'une précipitation valable en milieu sérique étant primordiale au cours des dosages de l'ACE dans le sang, nous avons procédé à de nouveaux essais sur d'autres lots de sérum humain normal, les résultats n'ont pas été plus favorables que les précédents.

b) Détermination du temps d'incubation nécessaire à la précipitation.

Les mêmes réactifs sont mis à incuber à + 4°C avec la quantité de deuxième antisérum déterminée dans l'expérience précédente, pendant un temps variant de 1/2 heure à 3 jours.

Essai	Antisérum anti ACE de lapin	ACE *	PBS + 1 mg/ml γ globuline	PBS + 1 mg/ml SAB	SHN	Deuxième Antisérum (mouton)
1	50	10	200	—	—	10 à 90
2	50	10	—	200	—	10 à 90
3	50	10	—	—	200	10 à 90

Tableau n° X

Détermination de la quantité nécessaire de deuxième antisérum
(les quantités sont exprimées en μ l)

Antisérum anti γ globulines de Lapin μ l	% de précipitation		
	PBS + Globulines de lapin 1	PBS + SAB 2	SHN 3
10	15,5	16,5	18,8
20	21,5	36	15,5
30	25,8	46,5	42,2
40	29,2	54,5	20,5
50	28	55,5	24,6
60	32,8	57,5	28,8
70	33,2	58,5	35,8
80	38,4	59,5	27,5
90	44,5	61,5	40

Tableau n° XI

Précipitation du complexe ACE*-Anticorps
en fonction de la quantité de deuxième antisérum.

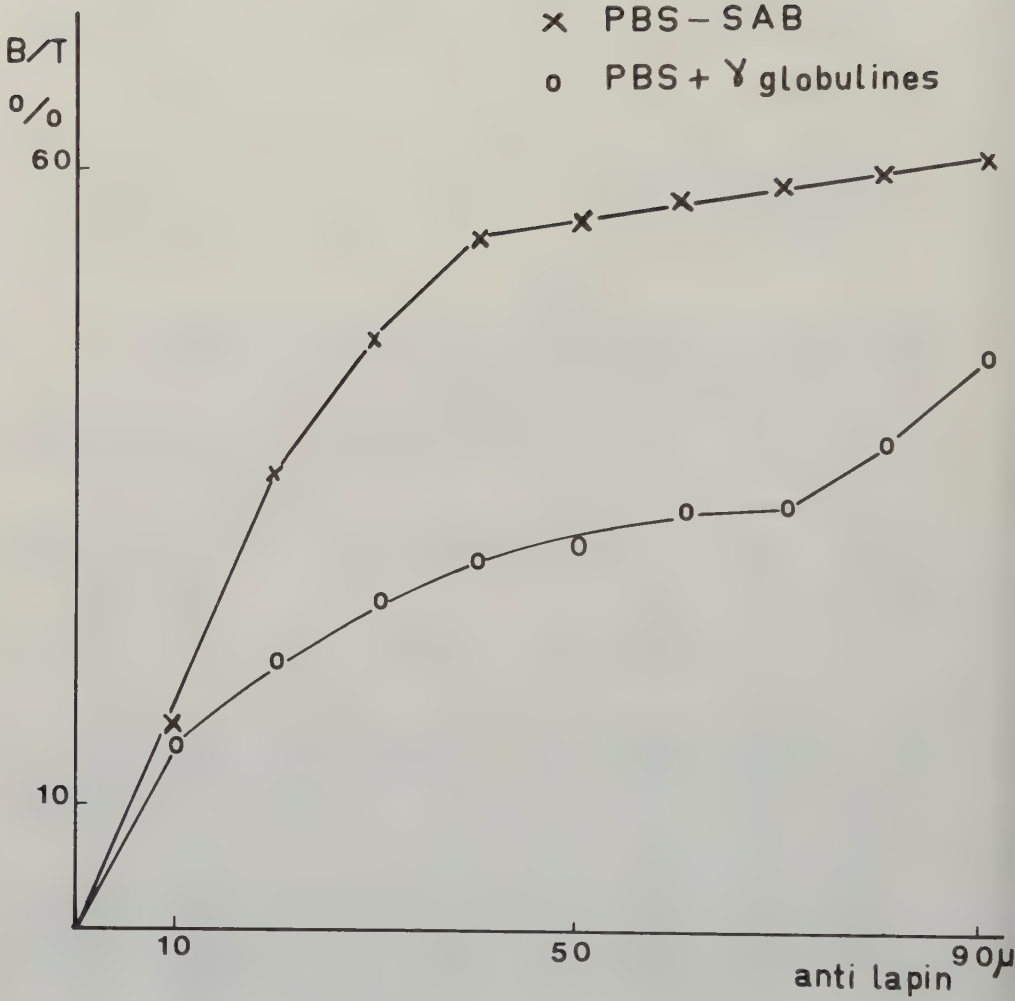


Figure n° 14

Précipitation du complexe en fonction de la quantité
du deuxième anticorps en différents milieux

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau n° XII.

Une précipitation de 24 heures nous paraît convenable.

Temps d'incubation	% de précipitation	
	PBS + 1 mg/ml SAB	Témoins en (PBS - SAB)
1/2 heure	46	2,5
24 heures	52	3
72 heures	53	3

Tableau n° XII
Précipitation du complexe ACE*-anticorps
en fonction du temps d'incubation

B - Précipitation du sérum anti ACE préparé sur le mouton

a) Détermination de la quantité nécessaire de deuxième anticorps

Le protocole est analogue à celui que nous avons suivi avec les antisérums anti ACE de lapin.

Les quantités respectives de chacun des réactifs sont reportés dans le tableau n° XIII.

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau n° XIV et la figure n° 15.

On observe que :

— l'addition de sérum de mouton normal au milieu, diminue notablement le taux de précipitation, à l'inverse de l'effet recherché.

— en présence de sérum de mouton normal, une quantité identique de l'antisérum précipitant donne un résultat équivalent en milieu tampon et en sérum humain, mais la précipitation est moins importante que pour le sérum humain seul, ou le tampon seul.

ESSAI	Antisérum anti ACE de mouton	ACE *	PBS + 1 mg/ml SAB	SHN	(1) SMN 1/5	Deuxième Antisérum (lapin)
1	50	10	210			10 à 100
2	50	10	200		10	10 à 100
3	50	10	10	200		10 à 100
4	50	10		200	10	10 à 100

Tableau n° XIII

Protocole de la détermination de la quantité nécessaire
de deuxième antisérum (les quantités sont exprimées en μ l)

(1) SMN : Sérum de mouton normal

% Précipitation				
Antisérum antibrebis lapin μ l	PBS	PBS + SMN	SHN	SHN + SMN
10	38	21	35	28,6
20	41.3	21.9	37.1	29.5
30	43.7	33.2	39	31.6
40	43	33.6	38.5	32.3
50	44	34.3	37.2	34.75
60	44.8	32.6	38	33.8
70	43.2	33.4	38	34.6
80	42	32.4	38	34.6
90	40.8	32.5	37.8	35
100	42.3	24.7	37	33

Tableau n° XIV

Précipitation du complexe ACE*-anticorps
en fonction de la quantité de deuxième antisérum

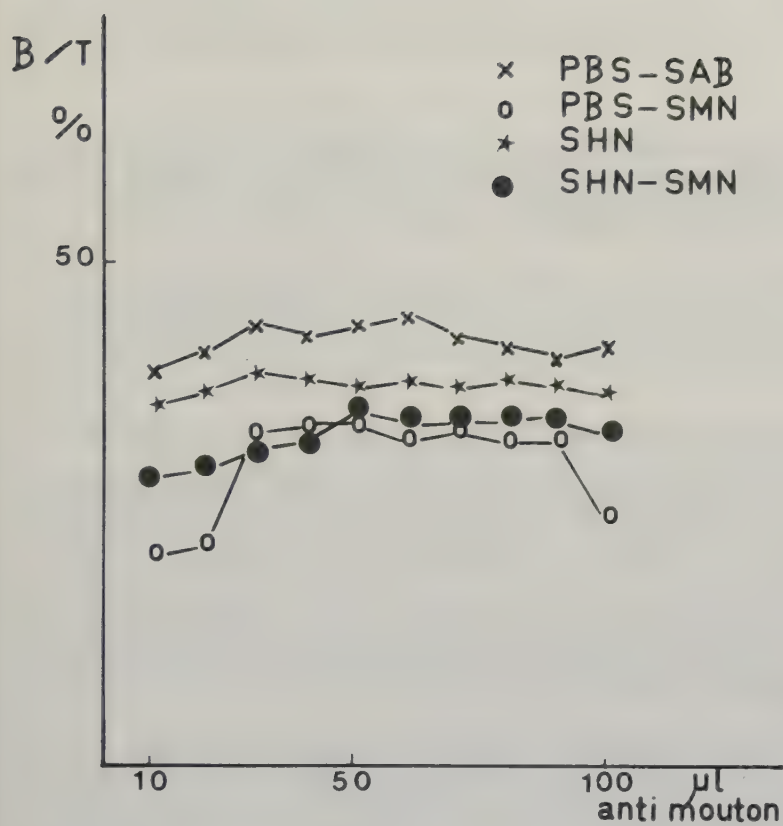


Figure n° 15

Précipitation du complexe en fonction de la quantité
du deuxième anticorps en différents milieux

Par le contrôle en gélose de la précipitation du deuxième anticorps avec le sérum de mouton normal, nous nous sommes aperçue que cet antisérum était dirigé contre toutes les fractions protéiques du mouton et non pas seulement contre ses γ globulines. Il peut donc donner avec l'antisérum un précipité suffisamment important pour être isolé facilement.

Ceci nous a amenée à ne pas ajouter de sérum de mouton normal dans nos réactions, mais à ne comparer entre elles que des précipitations effectuées dans le même milieu.

Par ailleurs, nous avons choisi d'utiliser 50 μ l de deuxième antisérum, car cette quantité située sur le plateau de précipitation est celle où les quatre essais sont les plus proches, de plus, elle uniformise nos deux protocoles.

b) Détermination du temps d'incubation nécessaire à la précipitation

Nous avons essayé des temps d'incubation de 24, 48 et 72 heures à + 4°C, après l'adjonction du deuxième antisérum. Les variations de précipitation du complexe sont faibles 45 à 52 % (cf. tableau n° XV).

Il ne nous a paru utile de prolonger ce temps au-delà de 24 heures, l'augmentation de la précipitation n'étant pas suffisamment intéressante pour justifier un allongement de la technique.

TEMPS d'incubation	% Précipitation			
	PBS 1 mg/ml SAB	SHN	TEMOIN (en PBS)	TEMOIN (en SHN)
24 heures	45	43	3	5
48 heures	50,5	45	2,5	5
72 heures	52	46	3	6

Tableau n° XV

Etude de la précipitation du complexe ACE*-anticorps
en différents milieux en fonction du temps d'incubation

Protocole retenu

Il est commun aux deux systèmes :

- Addition de 50 μ l du deuxième antisérum.
- Incubation de 24 heures à + 4° C.
- Isolement du précipité par centrifugation (MORGAN et LAZAROV (111). Les tubes sont centrifugés à grande vitesse : 13.000 rpm pendant 5 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf (zentrifuge 3200).
- Décantation et lavage du précipité avec du tampon PBS, après la deuxième centrifugation et la décantation, les tubes sont comptés en scintillation γ . Pour cette technique nous employons des micro tubes Beckman de 400 μ l.

La technique au double anticorps présente l'avantage de donner des taux faibles de précipitation pour le témoin, de 2 à 6 % selon le milieu, et elle ne nécessite pas un mode de calcul particulier pour clarifier les résultats. C'est une méthode reproductible, mais elle est longue, et les précautions à prendre nombreuses. De nouveaux contrôles s'avèrent nécessaires lors du changement de l'antisérum précipitant. Ses difficultés ont souvent été décrites à propos de divers dosages radioimmunologiques (112 - 113).

HALES et RANDLE en 1963 (114) en trouvant parfois des valeurs faussement élevées pour l'insuline dans le sérum, assurent qu'elles sont dues à une réaction croisée entre les γ globulines humaines et l'antisérum précipitant ; ceci entraîne une précipitation incomplète du sérum anti-insuline.

BRUNFELD et JORGENSEN (1967 (115) démontrent par immuno-électrophorèse l'existence d'une telle réaction croisée et rapportent que, dans certains cas, la précipitation du sérum anti insuline peut être plus grande lorsqu'elle se fait en milieu sérique, que lorsqu'elle est réalisée en milieu tampon enrichi d'albumine humaine. Une analyse effectuée dans ces conditions donne des résultats négatifs.

C'est pour palier cet inconvénient que HALES et RANDLE (1963) (116) ont introduit la technique de pré-précipitation par opposition à la post précipitation.

Quant à nous, nous n'avons pas eu cet inconvénient avec notre

antisérum anti protéines de mouton, nous l'avions en effet épuisé par du sérum humain normal selon le protocole décrit précédemment. Le sérum de mouton anti γ globuline de lapin, au contraire, présentait une réaction croisée, mais nous n'avons pas cherché à l'épuiser par le sérum humain, car son taux d'anticorps précipitants était très faible.

DISCUSSION

Nous venons d'exposer quatre modes d'isolement du complexe marqué antigène-anticorps, et nous les avons expérimentés sur notre système ACE anti ACE.

L'adsorption de l'ACE* par le charbon dextran n'a pas donné de résultats valables quand le milieu n'était pas un milieu tampon peu protéique. Nous ne l'avons donc pas employée.

La technique où l'antisérum lui-même est l'agent insolubilisant le complexe par sa polymérisation préalable, est particulièrement séduisante ; et si nous avons dû l'abandonner à cause de ses problèmes techniques, nous souhaitons entreprendre de nouveaux essais, ultérieurement.

Par contre, nous avons retenu les deux techniques par précipitation :

- celle au sulfate d'ammonium que nous avons employée avec nos antisérums anti ACE de mouton et de lapin,
- celle dite du double anticorps, que nous avons utilisée seulement avec les antisérums de mouton.

Le titrage de nos antisérums dont les résultats suivent, a été réalisé avec ces deux modes de séparation du complexe.

Interprétation des courbes de dilution

Le but est de connaître le titre en anticorps. Nous avons fait une courbe de dilution sur tous les antisérums que nous possédions. Ces courbes nous renseignent essentiellement sur la quantité d'anticorps contenus dans chacun d'entre eux. Par contre, elles ne nous renseignent que peu sur la qualité de ces anticorps. Cependant, la pente de la courbe de dilution peut orienter le choix de l'antisérum. En général, plus elle est grande, plus l'antisérum est sensible, c'est-à-dire se prête aux phénomènes d'échange entre l'antigène et l'antigène marqué. Mais seule une courbe d'inhibition va pouvoir donner des renseignements

précis sur ce comportement.

Nous donnons le résultat de six antisérums de lapin (répertoriés par numéros) et de deux antisérums de brebis appelés B11 et B13. Tous ces antisérums ont été préalablement épuisés par du plasma humain normal.

Les graphiques des diverses courbes obtenues sont rassemblées dans la figure n° 16.

— Sérums de lapin anti ACE

Les antisérums 218 et 223 ont un taux d'anticorps particulièrement faible, et sont inutilisables. Pour les autres, sauf avec l'antisérum 314, nous n'observons pas de palier, ce qui signifie que la dilution au 1/50ème est déjà trop élevée pour l'obtenir.

Néanmoins, leur pente est bonne et les dilutions donnant un rapport B/T voisin de 50 % se groupent autour de 1/200 à 1/400ème (1/600 à 1/800 pour le 314).

— Sérums de mouton anti ACE

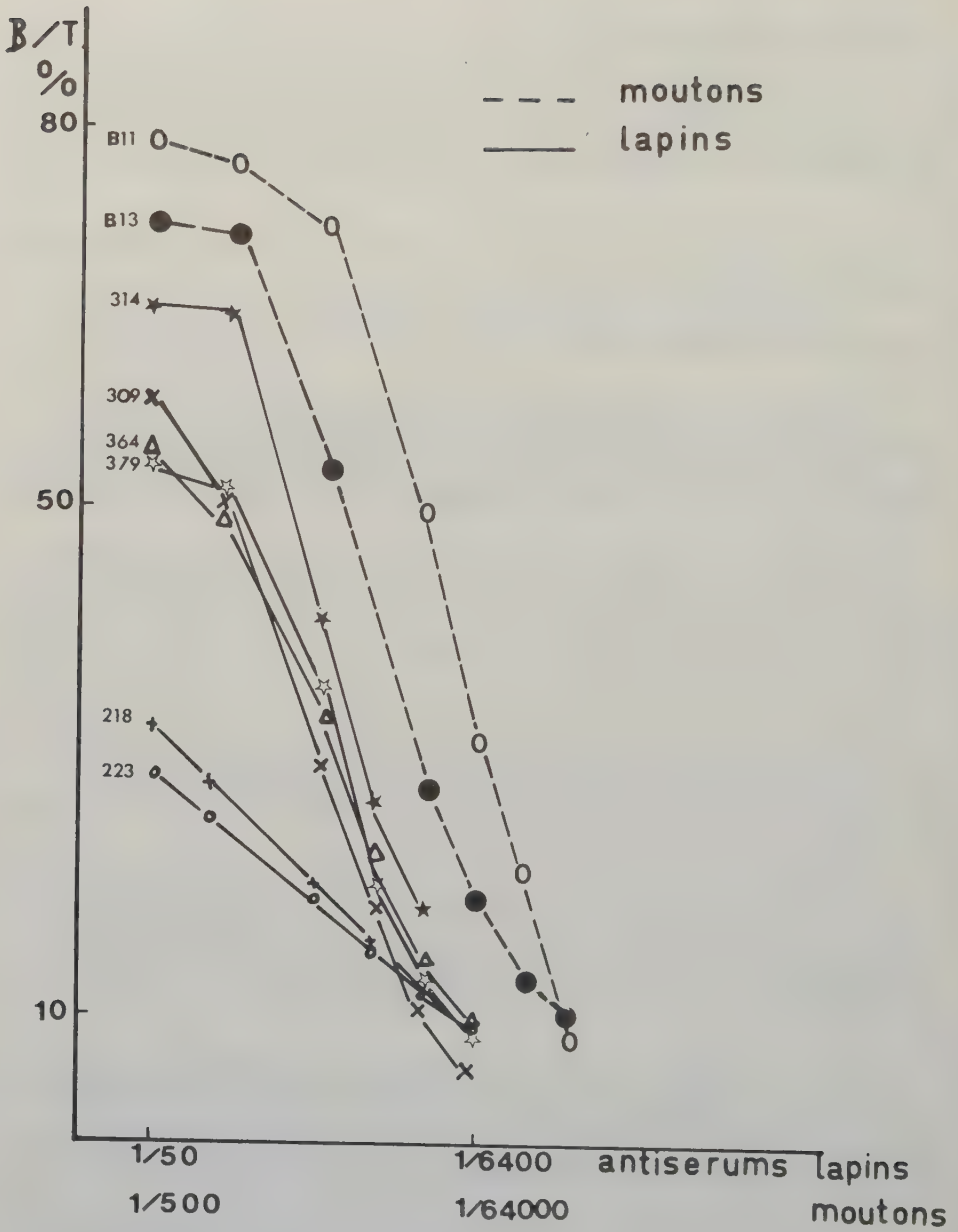
Nous n'avions que deux antisérums provenant de brebis. Ils ont des taux d'anticorps élevés et les dilutions correspondant au rapport B/T proche de 50 % sont entre 1/8000 et 1/16000 pour B13 et 1/32000 pour B11 leur pente est comparable.

On peut remarquer que les antisérums fournis par les lapins sont beaucoup moins riches en anticorps que ceux donnés par les brebis, puisqu'il existe un facteur dix entre les dilutions respectives de leurs antisérums.

Ainsi que nous l'avons dit précédemment, la brebis fournit plusieurs saignées utilisables et nous avons étudié la teneur en anticorps de trois saignées de la brebis B₁₁ : C, D et E correspondant aux saignées 3, 4 et 5 ; les deux premières n'ayant pas une concentration utilisable.

Les résultats sont portés dans la figure n° 17. Il apparaît que le taux en anticorps est maximum avec la saignée C, et qu'il diminue progressivement avec les deux suivantes.

Cet antisérum, à haute teneur en anticorps anti ACE, possède également une forte réaction croisée avec le NCA, ce qui oblige à une



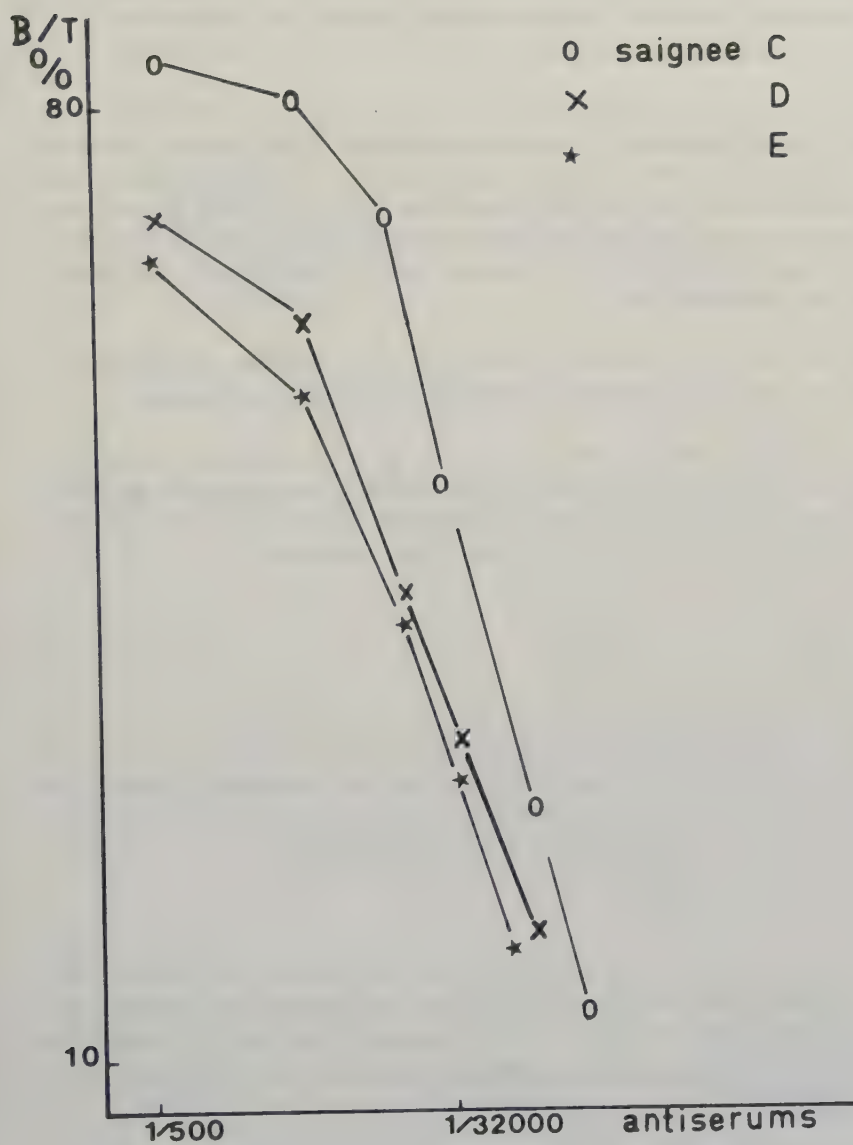


Figure n° 17
 Courbes de dilution de l'antisérum B 11

purification particulière pour le rendre monospécifique. Nous avons donc procédé à des épuisements par des extraits perchloriques de poumons suivant la technique précédemment décrite. Les poumons proviennent, en général, de malades décédés de maladies cardiaques.

Nous savons que l'adsorption d'un antisérum par un antigène à réaction croisée enlève une partie des anticorps dirigés contre l'antigène homologue. Ainsi sur les résultats de la figure n° 18, on peut noter que deux de ces antisérums épuisés ont un titre très voisin, une dilution au 1/6000 donnant un rapport B/T proche de 50 %. Ce titre est nettement plus faible que celui du troisième puisqu'une dilution au 1/10.000ème a donné le même résultat.

Enfin, pour le quatrième, une dilution au 1/25.000 est suffisante. Ce titre est très peu différent de celui de l'antisérum non épuisé.

L'explication logique de ces résultats est de penser que certains extraits perchloriques de poumons contiennent non seulement du NCA, mais également de l'ACE en quantité notable. Ceci a d'ailleurs été vérifié par dosage ainsi que nous l'exposons ultérieurement.

4 - Conservation des antisérums

a) par congélation

Nous avons en général réparti dans des tubes de 5 ml une quantité d'antisérum pré dilué de façon à pouvoir la diluer au volume prévu dans la réaction au moment du besoin. Nous avons vérifié que la réactivité n'était pas modifiée après deux à trois décongélations.

b) par lyophilisation

Afin de faciliter la conservation et éventuellement les possibilités d'échange avec d'autres équipes. La courbe de dilution de contrôle a été effectuée après dissolution de l'antisérum lyophilisé dans le tampon afin d'obtenir une solution correspondant à une dilution au 1/100ème de l'antisérum pur.

Les rapports B/T obtenus pour chaque dilution sont quasi identiques, variant de 83 à 72,5 % (tableau n° XVI). L'antisérum éprouvé est l'antisérum B 11 C dont nous savons que la dilution au 1/25.000ème donne un rapport B/T proche de 50 %. Il apparaît donc ici que cet antisérum ne supporte pas la technique de lyophilisation telle que nous l'employons (la congélation est peut-être trop lente) et ne réagit plus d'une façon normale avec l'antigène.

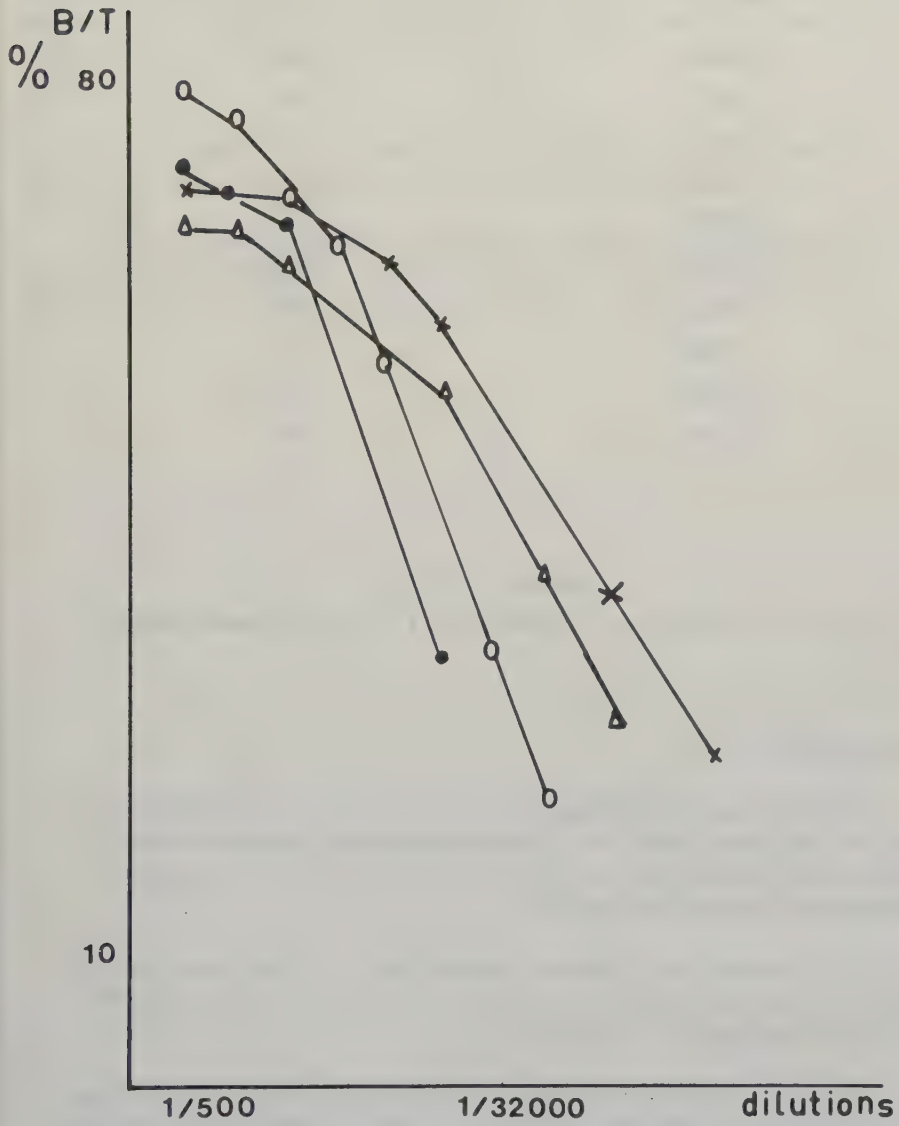


Figure n° 18

Courbes de dilution de l'antisérum B 11
après différents épuisements par l'extrait perchlorique de poumon

DILUTION	B/T en %
1/100	83
1/200	83
1/400	83
1/800	81,5
1/1600	76,5
1/3200	72,5
1/6400	72,5
1/12800	77
1/25600	74,5
1/51200	79
T	8

Tableau n° XVI
 Courbe de dilution de l'antisérum B 11 C après lyophilisation

DISCUSSION

Le titrage des antisérums selon le mode que nous venons d'envisager est insuffisant pour le choix des antisérums utilisables dans le dosage radioimmunologique. Il ne renseigne que sur la quantité des anticorps et non sur leur qualité.

Or, la qualité des antisérums dépend des caractéristiques de fixation des anticorps, c'est l'énergie de fixation de YALOW et BERSON et elle est évaluée par l'inhibition.

Toutefois, pour nous, c'est l'analyse des courbes de dilution qui a orienté le choix des antisérums pour la mise au point et la réalisation des courbes d'inhibition.

En ce qui concerne les antisérums de lapins, nous avons préféré les antisérums n° 309 et 314, leur immunoréactivité de départ est plus importante que pour les deux autres, et la pente de leur courbe de dilution est satisfaisante. Leur titre relativement faible (une dilution au 1/400 étant nécessaire pour obtenir 50 % du rapport B/T) peut être

un inconvénient car il entraîne une consommation accrue et la quantité totale de chacun est limitée à une saignée à blanc d'un lapin. Pour les antisérums de mouton, nous avons choisi B11, de meilleure réactivité de départ que B13, et nous avons travaillé avec l'antisérum de la saignée C.

Insistons enfin sur le fait que le choix définitif de l'antisérum ne sera fait qu'après la réalisation de courbes d'inhibition.

Dans ce chapitre nous avons examiné les différents réactifs du dosage radioimmunologique de l'antigène carcino-embryonnaire, c'est à celui-ci que nous allons consacrer le chapitre suivant.

Chapitre IV

TECHNIQUES EMPLOYEES POUR LE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE L'ACE

Dans ce chapitre, nous allons exposer la mise au point de la courbe d'étalonnage de l'ACE fondée sur le phénomène d'inhibition. Rappelons que le principe est une compétition entre l'antigène froid et l'antigène marqué pour se fixer sur les sites de l'anticorps. Pour une dilution donnée d'antisérum, le rapport antigène marqué lié aux anticorps sur antigène marqué total, diminue en présence d'antigène froid.

Nous avons étudié deux techniques que nous nommons, l'une macro-méthode et l'autre, micro-méthode, selon le volume total de la réaction.

La macro-méthode a une sensibilité maxima de 4 à 5 ng par essai, dans la micro-méthode nous avons une sensibilité nettement améliorée, jusqu'à 0,4 ou 0,5 ng.

Ces deux techniques ont chacune leurs applications que nous traiterons dans le chapitre suivant.

I — MACRO-METHODE

Notre méthode est inspirée de celle décrite par THOMSON et coll. (117), dans la publication relative à la mise en évidence de l'ACE dans la circulation sanguine. Comme eux, nous avons effectué une préincubation de 8 heures entre l'antisérum et l'antigène non marqué, avant l'addition de l'antigène marqué, ainsi que l'isolement du complexe par la méthode au sulfate d'ammonium. De plus, nous avons étudié les variations du milieu et l'isolement du complexe par la technique du double anticorps.

Toutes nos réactions ont été faites en tubes à hémolyse de verre pyrex ayant environ 9 mm de diamètre et contenant 5 ml. Les manipulations sont réalisées dans ces tubes, y compris la séparation du

complexe antigène marqué anticorps ; ces tubes peuvent être introduits dans ceux du scintillateur γ ce qui évite tout transvasement et protège le compteur contre les contaminations éventuelles.

Les dilutions données dans les tableaux et dans le texte, correspondent aux dilutions faites avant l'addition au milieu réactif.

A — REACTIFS

1 — L'antisérum

Il est dilué au moment de l'emploi dans le tampon utilisé de façon que le rapport B/T en l'absence d'antigène froid soit de 50 % environ. Le volume employé est de 200 μ l.

2 — L'antigène non marqué

Nous l'appellerons «étalon», malgré toutes les restrictions émises dans le premier chapitre, sur les difficultés d'apprécier parfaitement la pureté de l'antigène.

Nous avons réalisé chaque courbe d'étalonnage avec 9 à 10 points. La gamme est faite par dilutions successives de demi en demi, à partir d'une solution mère à 1mg/ml conservée congelée en petites fractions. Le premier tube contient 2000 ng d'ACE et le dernier 3,7 ng. Ces quantités sont mises sous un volume de 100 μ l.

3 — L'antigène marqué

On ajoute 100 μ l d'une dilution d'antigène marqué permettant d'obtenir environ 20.000 cpm dans ce volume. Dans nos conditions de marquage, la dilution nécessaire est généralement de l'ordre de 1/100.

4 — Tampon ou sérum humain

Selon les essais, on ajoute dans chaque tube de la gamme 200 μ l de tampon contenant de la sérum albumine bovine à 1 mg/ml, ou 200 μ l de sérum humain normal (mélange de donneurs de transfusion), volume employé ultérieurement dans les dosages. Nous avons utilisé

deux tampons, l'un est une solution à 9 g/l de chlorure de sodium tamponné à pH 7,4 par une solution de phosphate 0,1M, l'autre un tampon borate 0,025 à pH 8.

B — PROTOCOLE

Le mode opératoire suivi est résumé dans le schéma suivant :

Antigène étalon

ou

Tampon pour le témoin 100 μ l

Antisérum à la dilution

B/T = 50 % 200 μ l

Sérum humain normal

ou

Tampon 200 μ l

Pré incubation de 8 heures à + 4°C et addition de :

Antigène marqué

(dilution qsp 20.000 cpm) 100 μ l

Comptage en scintillation γ de tous les tubes de la réaction (T).

Incubation de 36 heures à + 4°C avant la séparation du complexe antigène marqué-anticorps.

Comptage du précipité en scintillation γ (B).

C — RESULTATS DES COURBES D'ETALONNAGE

1) *L'isolement du complexe est effectué par le sulfate d'ammonium.*

1 — ANTISERUMS DE LAPIN

a) En présence de 200 μ l de SHN

Nos essais ont été conduits avec l'antisérum n° 309, la dilution utilisée est au 1/400.

Les première courbes d'inhibition furent décevantes : il n'y avait pas d'inhibition notable, puisqu'avec 2000 ng d'ACE le rapport B/T

était encore de 43,7 %, alors qu'en l'absence d'antigène étalon, il était de 51,5 %.

Nous avons fait varier successivement les divers paramètres pouvant influencer le résultat, à savoir :

- l'antigène marqué
- l'antigène froid
- le tampon,

nous avons éliminé le facteur antisérum en contrôlant par immunodiffusion qu'aucune dénaturation n'était intervenue depuis son tirage.

Nous nous sommes procurée un antigène préparé par une autre équipe (1), et nous en avons marqué une partie aliquote, avec laquelle nous avons fait deux courbes d'inhibition, l'une en présence de l'antigène froid de la même origine, l'autre avec notre propre échantillon.

Les résultats ont été mauvais. Nous avons opéré dans le soluté de chlorure de sodium tamponné, nous avons alors décidé d'utiliser le tampon borate.

Les résultats obtenus, exprimés en pourcentage d'inhibition selon notre mode de calcul (décrit) sont portés dans le tableau n° XVII.

ACE	ACE — D (1)			ACE — V (2)		
ng/tube	% B/T	% du témoin	% Inh.	% B/T	% du témoin	% Inh.
Témoin	53	—	—	53	—	—
3,7	52	98,5	1,5	49,5	93,5	6,5
7,5	51	96,2	3,8	49,5	93,5	6,5
15	49,2	93	7	49,5	93,5	6,5
31	48	90,5	9,5	49,5	93,5	6,5
62,5	46,2	87,5	12,5	47,5	89,5	10,5
125	43	81	19	45,2	85,5	14,5
250	41	77,5	22,5	41,7	79	21
500	36,3	68,5	31,5	37	70	30
1000	34,3	64,5	35,5	33,7	63,5	36,5
2000	30,8	58,2	41,8	30,6	57,7	42,3

Tableau n° XVII

Courbes d'inhibition réalisées avec des échantillons d'ACE de deux origines

(1) ACE Dijon — (2) ACE Villejuif.

(1) Nous remercions le Professeur Martin du CHR de Dijon, d'avoir bien voulu nous envoyer un échantillon de l'antigène préparé dans son service.

De ces deux courbes, la première ACE — D est acceptable, montrant dès le début une inhibition croissant avec la quantité d'antigène froid, alors qu'avec notre échantillon, on doit atteindre des taux importants pour obtenir une courbe interprétable, après un début totalement en plateau.

Le seul facteur différent entre ces deux essais est l'antigène froid.

Nous avons alors remplacé notre ACE par un échantillon provenant d'une autre de nos préparations. Les résultats obtenus ont été du même type que ceux de la courbe ACE — D.

Remarque

La méthode d'isolement du complexe antigène-anticorps est ici comme nous l'avons dit, la méthode de précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation dans laquelle le rapport B/T des témoins de précipitation sans antisérum, atteint des valeurs de l'ordre de 20, 25 et même 30 %. Or nous voyons que ce chiffre est donné par le tube contenant 2000 ng d'ACE. Ceci nous a fait penser que la radioactivité retrouvée dans le culot de centrifugation de ce tube représentait celle de l'antigène marqué entraîné par phénomène physique, plutôt que par combinaison antigène-anticorps.

Pour le vérifier, nous avons fait un tube témoin d'adsorption (T «ad») sans antisérum, contenant l'antigène marqué et 2000 ng d'antigène étalon. Notre hypothèse a été confirmée, car les chiffres obtenus pour ce tube sont de 25 à 30 % et restent toujours voisins de ceux des rapports B/T trouvés dans les tubes contenant 2000 ng d'ACE et l'antisérum. Ce témoin supplémentaire a été fait lors de chaque courbe d'inhibition.

Comme pour le titrage des antisérums, le «blanc» élevé est fort gênant, car il masque l'inhibition réellement obtenue et nous oblige dans ce cas aussi à des artifices de calcul. Si le chiffre donné par le témoin d'adsorption est le pourcentage de radioactivité le plus bas pouvant être obtenu, nous posons qu'il représente l'inhibition maxima, soit 100 %.

De même, le rapport B/T du témoin ne contenant pas d'antigène froid, représente le chiffre le plus élevé de précipitation et donc 0 % d'inhibition.

Nous avons donc corrigé les chiffres de la courbe d'inhibition.

Les résultats sont consignés dans le tableau n° XVIII à côté des rapports bruts.

Ce pourcentage « corrigé » a été calculé comme suit : l'écart maximal possible va de 57 % à 28,8 %, et si l'on considère que le témoin antisérum équivaut à 100 % et le témoin d'adsorption à 0 % : $57 - 28,8 = 28,2$ correspond alors à 100, et 2,8 correspond à environ 10 % d'inhibition.

ACE ng	% B/T	B/T x 100 témoin	% Inhi- bition	B/T « corrigée »	Inhibition « corrigée »
Témoin	57			100	
3,7	56	98,2	1,8	96,4	3,6
7,5	54,5	95,5	4,5	91	9
15	53	93	7	85,8	14
31	50,5	88,5	11,5	76,8	23,2
62,5	46	80,5	19,5	60,6	39,4
125	43,5	76,2	23,8	51,8	48,2
250	40	70	30	39,3	60,7
500	37	65	35	28,5	71,5
1000	32	56	44	10,7	89,2
2000	31	54,5	45,5	7	93
Tém. «ad»	28,8				

Tableau n° XVIII

Courbe d'inhibition après séparation du complexe
par précipitation au sulfate d'ammonium.
Résultats bruts et corrigés par rapport au témoin.

$$3,7 \text{ ng} : 57 - 56 = 1 \quad \frac{10 \times 1}{2,8} \approx 3,6 \text{ d'inhibition.}$$

L'autre possibilité de calcul est la suivante : on peut également effectuer la correction en tenant compte du pourcentage de précipitation par rapport au témoin :

$57 - 28,8 = 28,2$ que l'on assimile à 100 %

$$56 - 28,8 = 27,2 \quad \frac{100 \times 27,2}{28,2} = 96,5 \%$$

etc...

On peut faire, à propos de cette courbe, les remarques suivantes :

- la sensibilité est mauvaise puisque, avec des quantités peu importantes d'ACE, l'inhibition est très faible, et les chiffres obtenus trop peu différents les uns des autres pour les utiliser avec sécurité ;
- dans ces conditions un dosage sur 200 μ l de sérum paraît impossible, puisque le taux circulant considéré généralement comme la limite supérieure de la normale est de 3 ng à 4 ng par ml, ce qui correspond selon l'expression de notre gamme à un tube qui contiendrait 0,6 ng d'ACE.

On devra donc opérer le dosage sur une plus grande quantité, et, pour cela, il est nécessaire afin de conserver les mêmes volumes de réactifs, d'accroître la concentration de l'ACE en procédant à son extraction par l'acide perchlorique, d'où l'essai suivant.

b) En présence d'Extrait Perchlorique

L'extrait perchlorique est préparé comme suit : à 5 ml de sérum, on ajoute un volume égal d'acide perchlorique 1,2 M. On agite et on laisse reposer 20 minutes à la température du laboratoire. On centrifuge et recueille le surnageant qui doit être limpide, dans un boyau de cellophane. On dialyse contre de l'eau courante froide pendant 24 heures puis contre plusieurs bains successifs d'eau distillée à + 4° pendant encore 24 heures pour éliminer l'acide perchlorique. Le dialysat est ensuite lyophilisé. Le poids d'extrait obtenu varie de 3 à 8 mg.

Nous remplaçons donc dans nos courbes d'étalonnage suivantes, les 200 μ l de SHN par 5 mg/tube d'extrait perchlorique de sérum humain normal, dissous dans 200 μ l de tampon.

Les résultats obtenus dans ces conditions sont réunis, comparativement à ceux réalisés en présence de SHN dans le tableau n° XIX.

Les deux courbes sont très voisines, et il n'y a pas de changement notable ni dans le témoin d'«adsorption», ni dans la sensibilité.

2 — ANTISERUM DE MOUTON

Nous avons ensuite effectué selon le même protocole les courbes d'inhibition avec l'antisérum B 11 dilué au 1/25.000.'

Les essais en présence de 200 μ l de sérum humain normal, et d'extrait perchlorique sont comparés dans le tableau n° XX.

ACE en ng	200 μ l SHN		5 mg extrait perchlorique SHN	
	B/T	% Inhibition	B/T	% Inhibition
Témoïn	57		48,5	
T «Ad»	28,8		23	
3,7	56	3,6	47,7	3
7,5	54,5	9	47	6
15	53	14	45,5	12
31	50,5	23,2	43,5	20
62,5	46	39,4	40,5	31,5
125	43,5	48,2	38	41,2
250	40	60,7	32,5	62,8
500	37	71,5	29	76,5
1000	32	89,2	26,7	85,5
2000	31	93	25	92,2

Tableau n° XIX

Courbes d'inhibition comparées obtenues avec l'antisérum de lapin en présence de SHN ou d'extrait perchlorique de SHN.

ACE en ng	200 μ l SHN		5 mg extrait perchlorique SHN	
	B/T	% Inhibition corrigée	B/T	% Inhibition corrigée
Témoïn	36		31,6	
T «Ad»	17		10	
3,7	34,7	7	30,2	6,5
7,5	33,4	13,5	28,5	14,5
15	32	21,5	26,5	23,5
31	28,8	38	21,4	46,2
62,5	24,6	60	17,5	65,5
125	22	74	14,5	78,3
250	20	84	13	86,2
500	19,1	89	12	90,5
1000	18,7	91	10,6	97,2
2000	17,5	#100	—	—

Tableau n° XX

Courbes d'inhibition obtenues avec l'antisérum de brebis B 11 C en présence de SHN ou de son extrait perchlorique.

2) Isolement du complexe par la méthode du double anticorps.

Comme lors de l'isolement du complexe par le sulfate d'ammonium, nous avons fait varier le milieu, et nous résumons les résultats obtenus dans le tableau n° XXI. Nous avons employé l'antisérum B 11 C, épuisé par l'extrait perchlorique de poumon (B 11 C pP) et non épuisé.

Pour B 11 C pP, la sensibilité des courbes est meilleure en présence d'extrait perchlorique de sérum. La courbe n° 5 a été réalisée avec un ACE d'un lot différent, et montre pour les mêmes quantités d'antigènes froid une plus grande inhibition. Pour B 11 C, dans les premiers tubes de la gamme il semble y avoir une augmentation de l'inhibition en milieu sérique, on peut penser que le NCA pourrait être à l'origine de ce résultat.

ACE ng/tube	B 11 C		B 11 C pP		
	SHN	Ext. Perchl.	SHN	Extrait Perchlorique	
3,7	5	1,5	3	5,8	7
7,5	10	4,5	5	11	18,5
15	18	6	8	17	25
31	37	24,3	29,5	20,5	41,3
62,5	56	42	55,5	41,8	60,2
125	65	68,2	68	70,5	73,4
250	78	83,2	77,5	83,5	78,5
500	82	86	86	85	82
1000	87	89	88	88	85

Tableau n° XXI

Courbes d'inhibition obtenues avec l'antisérum
B 11 C et B 11 pP en différents milieux.

Discussion

Hormis les applications au dosage de l'ACE, l'intérêt de ces courbes réside d'abord dans le choix définitif de l'antisérum après l'orientation donnée par les courbes de dilution. Ce choix est fixé à l'antisérum B 11 C et bien entendu nous avons par la suite utilisé essentiellement B 11 C pP monospécifique puisque préalablement privé de ses anticorps anti NCA.

On doit insister sur l'importance de la qualité de l'antigène. En effet, les courbes d'inhibition citées dans l'exposé de la technique au sulfate d'ammonium et la courbe n° 5 de la technique au double anti-corps, ont été réalisées avec un lot différent d'ACE dont la pureté devait être plus grande puisque, à poids égal, nous avons une inhibition plus importante.

Quel que soit le mode de précipitation du complexe les courbes d'inhibition ne sont pas satisfaisantes à différents égards :

- les variations des résultats dans la zone d'inhibition avec les quantités les plus faibles d'ACE, sont notables, nous obligeant à faire systématiquement une courbe d'étalonnage pour chaque série de dosages, alors que, logiquement, avec un même lot de réactifs, une seule aurait du suffire ;
- la sensibilité est médiocre, la quantité d'ACE détectable avec certitude étant 31 ng. Elle peut atteindre 7,5 ou 15 ng dans les meilleurs cas.

De ce fait, la technique d'inhibition telle que nous venons de la décrire n'a pu constituer qu'une étape de notre mise au point, car notre but, était le dosage direct de l'ACE dans le sérum, c'est-à-dire sans extraction perchlorique, et la sensibilité alors requise est de beaucoup supérieure à ce que nous avons obtenu. En effet, le chiffre généralement admis comme taux supérieur de l'ACE circulant est 3,9 ng/ml, et, si l'on considère que, techniquement, il est difficile de procéder à l'analyse sur une quantité de sérum supérieure à 200 μ l, il faudrait pouvoir détecter environ 0,7 ng/tube ; or ceci est loin de correspondre à notre étalonnage qui dans les conditions expérimentales étudiées, ne peut être amélioré.

C'est alors que nous avons envisagé une adaptation personnelle d'une microméthode inspirée de celle de EGAN et coll. (118), dont nous n'avons pratiquement retenu que le principe.

II — MICRO-METHODE

Dans celle-ci et dans ses applications, nous avons sélectionné un ACE (2287) qui a été comparé à celui de l'équipe de LAURENCE en Angleterre, et qui est celui dont la pureté nous a paru être la plus grande.

Les courbes d'inhibition sont effectuées dans des microtubes Beckman d'un volume de 400 μ l. L'isolement du complexe antigène

marqué-anticorps est opéré uniquement par la technique du double anticorps. Comme dans la macrométhode, les tubes utilisés peuvent être introduits dans ceux du compteur à scintillation γ et être comptés directement.

A -- LES REACTIFS

1 -- L'Antisérum

Il s'agit de l'antisérum B11 C pP, à une dilution qui varie selon les épuisements de 1/4000 à 1/20000, le volume employé est de 50 μ l.

2 -- L'Antigène

La quantité d'ACE est par tube de 0,4 ng à 100 ng, c'est-à-dire 200 μ l d'une solution contenant de 2,00 à 5,00 ng/ml.

3 -- L'Antigène marqué

Il est introduit sous un volume de 10 μ l, la dilution nécessaire à l'obtention de 15000 à 20000 cpm dans ces conditions est généralement de l'ordre du 1/100 (1/80 à 1/120).

Toutes les dilutions sont faites dans le tampon additionné au moment de l'emploi de sérum albumine bovine à raison de 1 mg par ml.

B -- ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES

Nous avons étudié l'influence de la composition du milieu (tampon et protéines), celle du temps de préincubation, ainsi que le rôle de la dilution de l'antisérum.

Le tampon

Nous avons comparé l'inhibition obtenue en présence de tampon borate 0,025 M à pH 8 et de tampon phosphate PBS, sans préincubation, c'est-à-dire en introduisant l'antigène froid, l'antigène chaud, et l'antisérum en même temps. L'incubation est de 24 heures à + 4°C avant l'isolement du complexe marqué.

Les résultats sont portés dans le tableau n° XXII et montrent que le tampon borate est moins favorable que le tampon phosphate, si bien que par la suite nous avons toujours utilisé ce dernier.

ACE en ng/ml	Inhibition % Tampon Borate	Inhibition % Tampon PBS
2,0	0	1,0
3,9	1,5	2,0
7,8	3,5	5,0
15,6	6,8	9
31,2	14	19,5
62,5	32,8	30,4
125	35	51,3
250	43,5	68,5
500	65,4	73,5

Tableau n° XXII

Influence du tampon sur l'inhibition (sans préincubation)

La préincubation

Nous avons fait varier le temps de préincubation de l'antigène étalon et de l'antisérum avant l'addition de l'antigène marqué, le temps d'incubation restant fixe.

Nous avons successivement laissé le mélange en contact 5 heures, 8 heures, 24 heures, 30 heures, 36 heures et 48 heures. Les résultats sont groupés dans le tableau n° XXIII.

Le temps de préincubation a une grande influence sur le résultat, la pente de la courbe d'inhibition est plus accentuée pour les petites quantités d'ACE avec une préincubation relativement longue. En effet, faible après 5 heures, la sensibilité augmente pour 8, 24 et 30 heures qui donnent des résultats comparables, et elle est maxima pour 36 et 48 heures.

Nous avons adopté 48 heures de préincubation qui représente le temps le plus maniable dans le déroulement de nos dosages.

Notons que la période de préincubation varie avec le système employé : dans le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire selon la

technique de EGAN et coll. (119) et celle de LAURENCE et coll. (120) il n'y a pas de préincubation. D'autres auteurs préconisent 2 heures à 37° C (121), et 14 heures à 37° C (122) ou même 1/2 heure à 45° C (123) ; mais aucun à notre connaissance, n'a utilisé un temps aussi long que le nôtre. Il n'existe pas de protocole universel, ceci est normal, puisque tous les réactifs utilisés sont préparés sur des animaux différents dont les réponses individuelles peuvent être grandes, et à partir d'un matériel tumoral variable.

ACE en ng/ml	% Inhibition					
	Temps de préincubation					
	5 heures	8 heures	24 heures	30 heures	36 heures	48 heures
2,0	1	0,5	0,5	2,5	6	4
3,9	1	1,5	1	6	12	8,5
7,8	1,5	4	2,5	8,5	15	12
15,6	5,5	9	8	13	23	22
31,2	11	24	24,5	26,5	36	35
62,5	25,5	40	35	49	54	65
125	42,5	67,5	68	69,7	73,5	80,5
250	70,5	79	88	84	84,5	88
500	85	84	91	91	91	91

Les protéines du milieu

Les dosages de l'ACE devant être faits essentiellement dans le sérum, nous avons étudié les courbes d'inhibition en milieu sérique comparativement au milieu PBS-SAB.

L'antigène est solubilisé aux mêmes concentrations dans du sérum humain normal. Le témoin de précipitation de l'antisérum et de l'antigène marqué est effectué avec ce même sérum humain réparti en fractions de 200 μ l dans les tubes où sera opérée la réaction pour éviter des décongelations successives, qui, d'après ce que nous avons observé, diminuent progressivement le rapport B/T. Il en est de même pour chaque concentration de la gamme étalon.

Les temps de préincubation étudiés sont : 0, 24 et 48 heures. Les résultats sont portés dans le tableau n° XXIV.

ACE ng/ml	% Inhibition		
	0 heure	24 heures	48 heures
2	0,6	4	6,5
3,9	3	10	15
0,8	5,2	28	34
15,6	8	45	48
31,2	15	58	68,5
62,5	24	74	79
125	40	83	87
250	65	—	—
500	74	—	—

Tableau n° XXIV
Courbe d'inhibition en milieu SHN
en fonction du temps de préincubation

Il est bien connu que la concentration protéique du milieu d'incubation est un facteur important, lorsque les méthodes d'adsorption sont utilisées pour la séparation du complexe marqué (FELBER et coll. 1966 (124), YALOW 1968 (125)), tandis qu'elle n'influence pas dans d'autres techniques. Cependant certains auteurs (GALSKOW 1972 (126)) montrent que la concentration en protéines peut aussi être d'importance dans la technique du double anticorps.

En ce qui nous concerne, nous voyons qu'après 24 et 48 heures de préincubation, nous avons une sensibilité meilleure que celle trouvée en milieu tampon avec les mêmes temps. On peut se demander, puisqu'il y a un certain taux d'ACE circulant dans le sérum si cette quantité se surajoutant à celle de l'étalon, explique l'augmentation de sensibilité des premiers tubes en accroissant la quantité d'antigène froid. Mais cette explication n'est plus valable dès que les concentrations dépassent 7,8 ng/ml, car la quantité d'ACE apportée par le sérum humain est faible par rapport à celle de l'étalon dans ces tubes.

La dilution de l'antisérum

Nous avons procédé à trois dilutions de l'antisérum de telle sorte que le rapport B/T du témoin en l'absence d'antigène froid soit voisin de : 33 %, 50 %, et 65 % environ (en fait de 37, 47,3 et 64,3 %).

Après une préincubation de 24 heures, les pourcentages retenus

pour les témoins représentant la moyenne de 5 essais, et les courbes d'inhibition réalisées dans ces conditions donnent les résultats portés dans le tableau n° XXV et la figure n° 19.

ACE ng/ml	B/T du témoin		
	37 %	47,3 %	64,39 %
2,0	6,5	4	0,5
3,9	12,5	8,5	1
7,8	22,5	12	2,5
15,6	40,5	22	9
31,2	59	35	21
62,5	76,5	65	37
125	84	80,5	63
250	89	88	83
500	—	91	91

Tableau n° XXV

Courbes d'inhibition en fonction de la dilution de l'antisérum

Il apparaît que la sensibilité la meilleure est obtenue avec la plus grande dilution d'antisérum, ainsi que l'on pouvait s'y attendre, conformément à la théorie du dosage radioimmunologique. Les deux courbes dont les témoins ont un B/T respectivement de 37 et 47,3 % sont les seules satisfaisantes puisqu'elles donnent de bonnes inhibitions avec les quantités les plus faibles d'ACE. La différence de sensibilité entre les deux dilutions est particulièrement nette dans les premiers points de la gamme.

On peut se poser le problème de savoir si l'on doit travailler avec l'une ou l'autre dilution, sachant que l'une apporte une plus grande sensibilité mais perd un peu dans l'éventail des mesures, et que l'autre donne moins de précision pour les concentrations faibles d'ACE.

Nous avons en général opté pour la dilution donnant un B/T voisin de 40 % estimant que la précision du dosage était suffisante pour les concentrations sériques basses et que les concentrations plus élevées pouvait être mesurées correctement jusqu'à 125 ng/ml, alors que pour une dilution plus grande de l'antisérum, la courbe commence à s'infléchir entre 62,5 et 125 ng/ml.

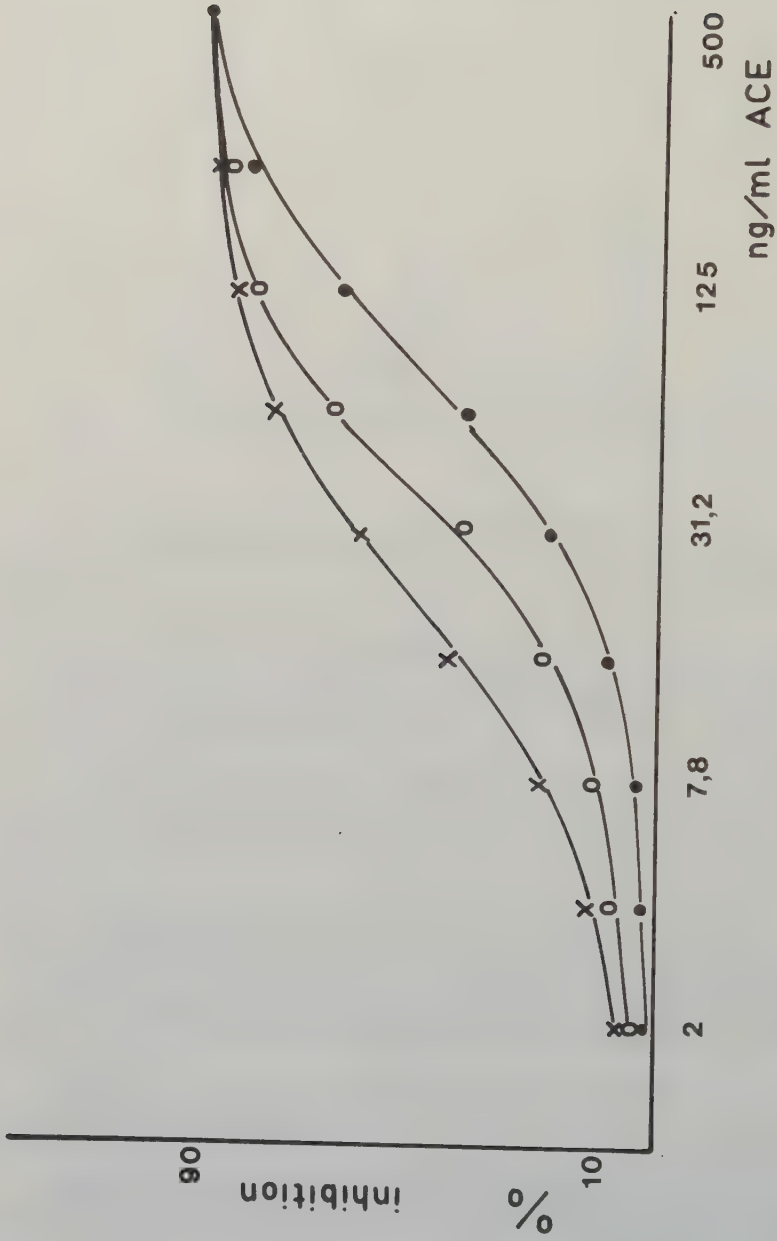


Figure n° 19
 Courbes d'inhibition en fonction de la dilution de l'antisérum

C -- PROTOCOLE RETENU POUR LA MICROMETHODE

Le protocole définitif est le suivant :

- péincubation de 48 heures, à une température de $+ 4^{\circ}$, pour les gammes d'ACE faites en milieu sérum humain normal ainsi que pour celles effectuées en milieu tampon ;
- adjonction de l'ACE marqué et incubation de 24 heures à $+ 4^{\circ}$ également ;
- addition du deuxième antisérum, comptage de la radioactivité des tubes en scintillation γ , et incubation de 24 heures, toujours à $+ 4^{\circ}$;
- centrifugation pendant 5 minutes à 12.000 tours/minutes ;
- Décantation par aspiration à la trompe à vide du précipité et lavage par 200 μ l de tampon P B S — S A B ;
- remise en suspension du précipité par agitation à l'agitateur Vortex, nouvelle centrifugation de 5 minutes, comme précédemment ;
- deuxième décantation par aspiration à la trompe à vide et comptage du précipité en scintillation γ .

D — ETUDE CRITIQUE DE L'ANALYSE

a) Reproductibilité

La reproductibilité a été étudiée à plusieurs reprises et en double exemplaire. Lors de chaque expérience, les réactifs utilisés sont exactement les mêmes, y compris l'antigène marqué. La dilution de l'antisérum est identique. Les courbes obtenues sont comparées dans la figure n° 20. Les variations des pourcentages d'inhibition sont plus importantes pour les faibles concentrations d'ACE (chiffres extrêmes pour 2 ng/ml : 4 et 7 %). Ces différences interviennent assez peu dans l'interprétation des résultats, car à cet endroit, la courbe est relativement plate, et les teneurs mises en cause sont inférieures aux concentrations pathologiques. Dans la partie moyenne et haute de la courbe, les différences sont moindres (valeurs limites pour 30 ng/ml : 57 et 62 %).

b) Spécificité de l'analyse

- 1) La spécificité de l'analyse dépend en partie de celle de l'anti-

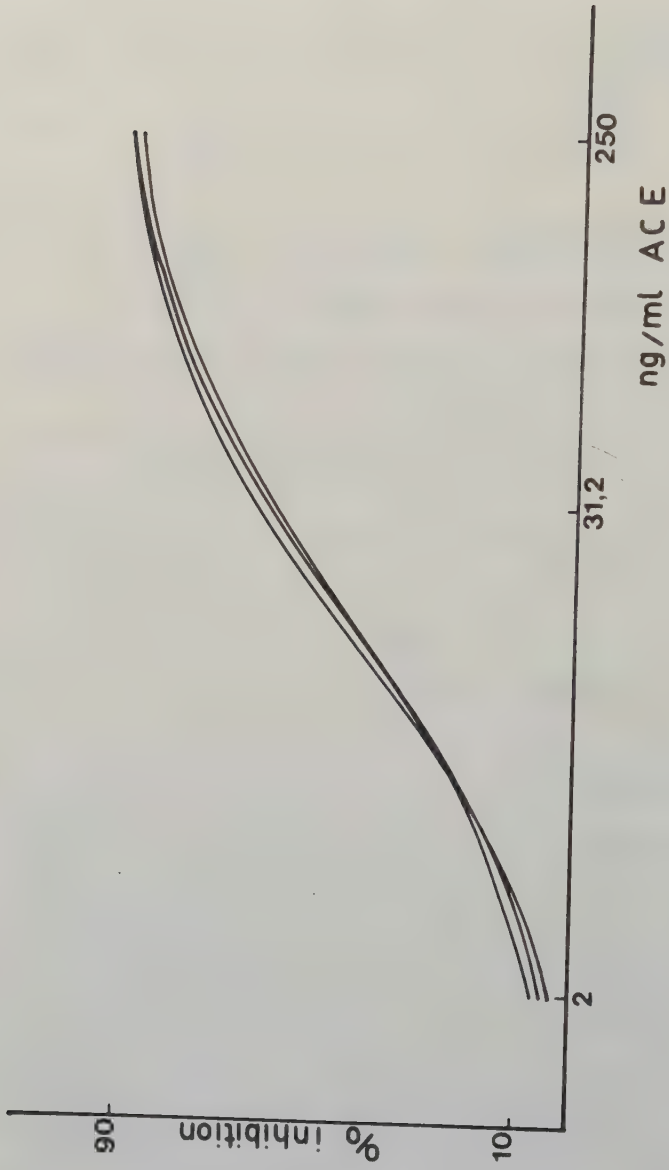


Figure n° 20
Reproductibilité de la courbe d'inhibition de l'ACE

sérum. Or nous avons vu que l'antisérum B11C n'était pas spécifique, il donne une réaction croisée avec le NCA. Après épuisement par un extrait perchlorique de poumon humain normal, la réaction croisée n'est plus mise en évidence en immunodiffusion selon la technique d'OUCH-TERLONY. Cette technique n'ayant pas une sensibilité aussi grande que le dosage radioimmunologique, il nous a paru important de contrôler que le NCA n'inhibait pas la réaction ACE marqué anti ACE, et de confirmer ainsi le résultat de la technique classique.

Nous avons donc réalisé une courbe d'inhibition dans laquelle l'ACE froid est remplacé par du NCA, à des concentrations variant de 2 à 500 ng/ml. Ce sont les mêmes quantités que celles d'ACE utilisées dans les courbes d'étalonnage.

Le protocole opératoire suivi est celui d'une courbe d'inhibition par l'ACE. Les résultats obtenus montrent qu'après épuisement par un extrait perchlorique de poumon, l'antisérum est rendu spécifique vis-à-vis de l'ACE, puisqu'il faut atteindre le taux de 250 ng/ml de NCA pour obtenir une inhibition correspondant environ à celle de 2 ng/ml d'ACE.

Mais on peut se demander si, au cours de sa préparation, le NCA ne risque pas de contenir un certain pourcentage d'ACE et ce serait cette contamination qui donnerait la réaction d'inhibition. Afin d'éliminer ou de confirmer cette hypothèse, nous avons effectué une nouvelle courbe avec des doses plus importantes de NCA, pour voir si nous obtenions une courbe superposable à nos courbes habituelles et dans ce cas, nous aurions affaire à de l'ACE, ou au contraire à une courbe d'un type différent. Les concentrations de NCA employées sont 625, 1250, 2500, 5000 et 10000 ng/ml. Nous avons tracé cette courbe d'inhibition à côté d'une courbe réalisée avec l'ACE dans la figure n° 21. Compte-tenu d'un facteur 100, cette courbe d'inhibition est superposable à celle obtenue avec l'ACE. Nous en déduisons que l'inhibition est due non pas au NCA, mais à de l'ACE le contaminant à un taux de 1 p 100 environ. L'antisérum B 11 C est donc bien, après épuisement, monospécifique vis-à-vis de l'ACE.

2) La spécificité dépend également de l'antigène. Une condition nécessaire, mais non suffisante, est que : lorsque l'antigène plasmatique est mesuré à différentes concentrations (c'est-à-dire différentes dilutions de plasma), il réagit selon la même courbe que l'antigène étalon. Si cette condition est satisfaite, la concentration antigénique mesurée suivra linéairement la dilution plasmatique (127).

Nous avons ainsi dilué un sérum dont la teneur en ACE était très forte, puisque l'inhibition obtenue était de l'ordre de 92 % pour 200 μ l.

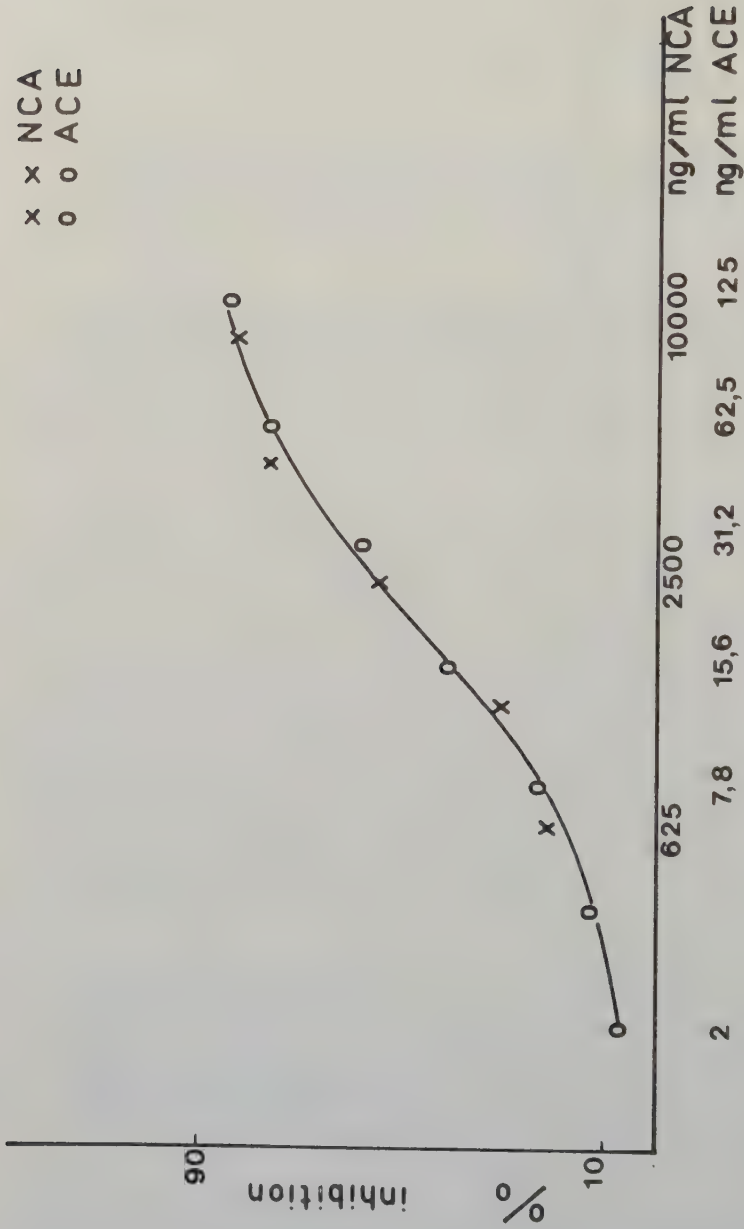


Figure n° 21

Courbes d'inhibition comparées de l'ACE et du NCA

Cette inhibition correspond à un taux supérieur à 125 ng/ml, et vraisemblablement compris entre 500 et 1000 ng/ml. Le taux exact est difficile à préciser car nous nous trouvons dans la partie de la courbe la moins sensible puisque très plate.

Nous avons d'abord déterminé la concentration exacte de l'ACE dans ce sérum. Pour cela, nous avons effectué un premier essai avec 10, 20, 50 et 100 μ l de sérum en complétant le volume à 200 μ l avec le sérum humain normal utilisé pour les témoins et pour la gamme d'ACE. Les pourcentages d'inhibition nous ont permis de chiffrer la teneur entre 700 et 800 ng d'ACE/ml. Nous avons alors recommencé l'expérience en diluant le sérum au 1/20ème avec le sérum humain normal. Les doses utilisées et les résultats sont reportés dans le tableau n° XXVI. Nous voyons que les valeurs plasmatiques calculées se superposent à celles de la courbe d'étalonnage. La concentration d'antigène mesurée est bien proportionnelle à la dilution du sérum.

Dilution finale du sérum	% Inhibition	ng/ml trouvés	ng/ml prévus
1/400	11	2	1,8 à 2
1/200	19,5	4	3,5 à 4
1/100	29	7,8	7 à 8
1/40	52	17,5	17,5 à 20
1/20	75	40	25 à 40
1/10	81	64	70 à 80

Tableau n° XXVI

Inhibition obtenue avec les dilutions d'un sérum

Discussion

L'avantage de cette méthode par rapport à la précédente est d'avoir la sensibilité que nous désirions atteindre. En effet 4 à 6 % d'inhibition sont obtenus avec une quantité d'ACE de 0,4 ng contenus dans 200 μ l, ce qui correspond à une concentration de 2 ng/ml.

Si l'on compare la sensibilité obtenue à celle de la macrométhode, on voit qu'elle est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène marqué introduite. A une sensibilité dix fois plus grande, correspond une quantité d'antigène marqué dix fois plus petite.

Son plus grand inconvénient est sa longueur, puisqu'il faut attendre 5 jours pour avoir un résultat. A ce propos, nous devons faire quelques remarques. La nécessité absolue d'un temps de préincubation long, pose le problème de savoir si l'affinité de l'antigène marqué vis-à-vis de l'antisérum n'est pas plus grande que celle de l'antigène froid, car, si nous ne donnons pas à ce dernier un temps suffisant pour sa fixation, les sites de l'anticorps sont occupés par l'antigène marqué sans donner pratiquement lieu aux phénomènes d'échange et l'inhibition est presque nulle.

Nous avons envisagé l'hypothèse que l'équilibre de la réaction était peut-être long à s'établir. Nous savons que certains dosages radioimmunologiques demandent 3, 4 et même 5 jours d'incubation pour que la réaction antigène marqué, antigène froid et anticorps soit stable. Nous avons essayé sur notre système une incubation de 4 jours, le résultat fut mauvais, l'inhibition faible.

Il y a donc bien dans notre cas nécessité d'une préincubation, et d'une préincubation longue, que nous avons longtemps hésité à faire, car la théorie admise généralement par certains chercheurs travaillant sur le sujet était qu'après une préincubation de quelques heures il était impossible de déplacer l'antigène froid.

D'un autre côté, on peut se demander, si l'antisérum qui possède une quantité importante d'anticorps, présente une sensibilité suffisante, et s'il n'a pas une énergie de liaison trop forte pour se prêter facilement aux phénomènes d'échange. Nous n'avons pas de renseignements particuliers sur le comportement des antisérums anti ACE de mouton, étant les seuls à avoir utilisé cet animal. Les équipes américaines et anglaises emploient généralement la chèvre, et les équipes françaises et belges, le lapin.

Enfin, en ce qui concerne l'antigène (2287) ayant servi dans cette technique, nous l'avons comparé à celui de LAURENCE et coll. de la manière suivante : nous avons utilisé parallèlement notre antigène froid et celui de LAURENCE pour réaliser une courbe d'inhibition avec leur antisérum et leur antigène marqué, dans leurs conditions opératoires habituelles. Les résultats obtenus avec notre antigène se sont avérés peu différents de ceux obtenus avec leur propre antigène. Rappelons que la composition de l'ACE 2287 est très voisine de celle des autres échantillons dont nous connaissons l'analyse.

Nous avons réalisé la majeure partie des dosages rapportés dans le chapitre suivant avec la micro-méthode, en utilisant donc la technique du double anticorps pour isoler le complexe marqué. Or, nous avons vu que la précipitation n'était pas tout à fait identique dans un milieu tampon, ou dans le sérum humain. Pour pallier cet inconvénient, nous avons effectué nos courbes d'étalonnage en milieu tampon lorsque les dosages avaient lieu en solution peu protéique, et en sérum humain normal lorsque nous faisions des dosages sériques. Nous nous proposons de discuter de la validité de cette façon d'opérer, au moment de l'exposé de nos résultats.

Quant à la macrométhode, si elle est peu satisfaisante lors du dosage sérique direct de l'ACE, elle a un certain intérêt pour les dosages sur extrait perchlorique. Avec isolement du complexe par le sulfate d'ammonium, nous l'avons dans un premier temps utilisée, car elle est rapide et facile à mettre en œuvre.

Chapitre V

APPLICATIONS DU DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE L'ÂGE

1 — Nous allons d'abord rapporter les expériences faites en utilisant la macro-méthode.

a) Nous avons dans un premier temps comparé les résultats de deux séries d'analyses, l'une en utilisant directement les sérums, l'autre leurs extraits perchloriques. L'antisérum employé est B 11 C.

Le sang recueilli sans anticoagulant, le sérum séparé rapidement, est conservé congelé, et il n'est pas décongelé plus de deux fois. L'extrait perchlorique de sérum est préparé selon la technique décrite page 83.

Deux courbes étalon sont faites, une pour chacun des milieux. Chaque dosage est réalisé en double.

Les essais sont réunis dans le tableau n° XXVII, ils comportent dix sérums normaux, et dix sérums provenant de maladies bénignes ou de cancers du tube digestif.

Comme on pouvait le prévoir, les résultats des dosages exécutés sur extrait perchlorique sont plus reproductibles donc meilleurs, ils correspondent à une prise d'essai de cinq ml, et l'inhibition observée est située dans la zone sensible de la courbe d'étalonnage.

Quant aux chiffres obtenus pour les dosages directs, ils sont très élevés, donc peu interprétables. Il semble y avoir dans notre système, une interférence avec un constituant du sérum, autre que l'ACE ; c'est une hypothèse difficile à retenir puisque l'antisérum a été épuisé par du sérum humain normal. Toutefois, comme cet antisérum est le B 11 C, qui n'est pas épuisé par de l'extrait perchlorique de poumon, le NCA, également circulant pourrait contribuer à l'inhibition.

SERUMS NORMAUX	Dosage sur Extrait Perchlorique mg/ml		Dosage sur 200 μ l de sérum mg/ml	
1	1,4	1	300	300
2	< 1	< 1		
3	< 1	< 1	150	
4	< 1	< 1	90	
5	2,8	1	400	450
6	1	< 1	55	80
7	< 1	< 1	225	300
8	7,6	6,6	45	55
9	1	< 1	250	225
10	2,5	1	< 3,7	< 3,7
M. BENIGNES DIGESTIVES				
11	3,9	5	< 3,7	< 3,7
12	2		45	35
13	1,4	1	25	30
14	1,7	2,3	22	35
CANCERS DIGESTIFS				
15	5,6	5	< 3,7	< 3,7
16	4,5	3,5	70	60
17	6,5	8	< 3,7	< 3,7
18	7,6	7,6	15	25
19	10,5	12	40	30
20 (1)	16	—	37	30
(2)	4,5	5,5	< 3,7	< 3,7

Tableau n° XXVII

Dosages de l'ACE sur extrait perchlorique ou sur sérum. Antisérum utilisé : B11C

20 (1) Néoplasmes du rectum avant opération — 20 (2) Néoplasmes du rectum après opération

b) Dans une seconde série de dosages, nous montrons les résultats obtenus sur les sérums et leurs extraits perchloriques mis en présence des deux antisérums : B 11 C et B 11 C_P (Tableau n° XXVIII, les chiffres donnés sont la moyenne des deux essais). Ces chiffres ont pour seul but de comparer les deux antisérums, sans tenir compte de la pathologie éventuelle des sérums employés dans nos réactions.

On voit que tous les dosages effectués avec l'antisérum non épuisé en NCA ont des valeurs plus élevées ; il existe donc bien une action inhibitrice propre au NCA qui s'ajoute à celle de l'ACE. La discordance entre les deux séries est nette sur tous les sérums sauf un.

Là encore, les dosages directs sont peu satisfaisants, mais nous devons nous y attendre puisque la sensibilité de la technique est faible et l'inhibition trop peu importante pour produire une différence de rapport B/T interprétable. De plus comme la prise d'essai est de 200 μ l, l'erreur au niveau de la lecture sur la courbe d'étalonnage, est multipliée par cinq pour calculer le taux par ml.

	B 11 C pP		B 11 C	
	Ext. perchlor. $\mu\text{g/ml}$	200 μl SHN $\mu\text{g/ml}$	Ext. perchlor. $\mu\text{g/ml}$	200 μl SHN $\mu\text{g/ml}$
1	5,3	33	7,6	82
2	3,6	34	5,6	75
3	4,6	40	6,2	70
4	10,2	34	17,7	75
5	9	36	9,2	75
6	5,6	29	8,6	60
7	10,2	36	10	—
8	45	140	50	150
9	3,9	10	9,2	12
10	8,7	6	10,6	11
11	9	10	10,3	12
12	8,3	6	9,8	18,5
13	6	7,5	8	20
14	17,5	35	22,5	50
15	9,8	22,5	13	12
16	24,5	—	28	—
17	13,5	10	12	12
18	4,3	<3,7	8,6	12
19	10,2	37	20	15
20	5	8	7	18

Tableau n° XXVIII

Dosages comparatifs de l'ACE
 Antisérums utilisés : B 11 C et B 11 C pP

ACE µg/ml	% Inhibition						
	2287	3000-I	3000-6	NiBSC	Montpellier	3000-II	GOUIN
2	6,5	8	5	1	4	15	15,5
3,9	12,5	12	10,5	8	12,5	22,5	18,5
7,8	22,5	24,5	28	16,5	19	37,5	22
15,6	40,5	43	47,5	35	36	54	34
31,2	59	66	68	55	48	70	49
62,5	76,5	78	78	74	68,5	80	64
125	84	85	84	84	77,5	83	75
250	89	86,5	85	88	82,5	88	79
500	—	—	86	90	85	—	83,5

Tableau n° XXIX
Courbes d'inhibition comparées de divers échantillons d'ACE

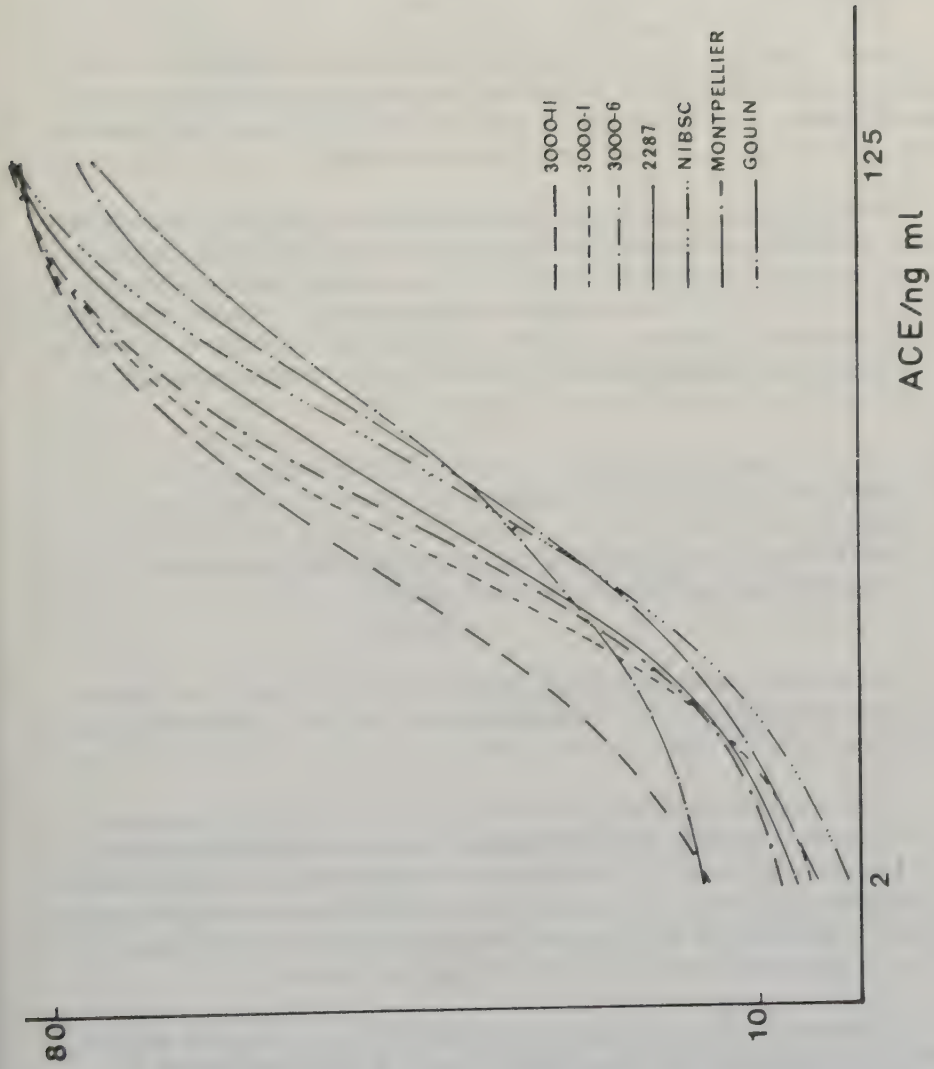


Figure n° 22

Courbes d'inhibition obtenues avec différents échantillons d'ACE

2) Les courbes figurant à droite

Elles demandent, pour la même inhibition, une plus grande quantité d'antigène froid que les précédentes. Elles sont obtenues avec les ACE Montpellier
NIBSC

Il est à remarquer que l'ACE NIBSC provenant d'Angleterre a été préparé par la technique de séparation chromatographique sur colonne, selon la méthode de Gold, mais à partir du même foie que l'ACE Montpellier préparé par extraction immunoperchlorique.

Donc l'antigène obtenu par deux techniques différentes à partir du même matériel, a un pouvoir inhibiteur identique, mais différent de celui des antigènes précédents. Nous ne pouvons pas affirmer à l'heure actuelle que cela est dû à la composition chimique de l'antigène, bien que nous le pensions. Une analyse biochimique poussée, mettant en évidence les différents constituants de ces deux ACE par rapport à ceux des autres échantillons, pourrait seule en faire la preuve.

3) Les courbes représentées à gauche

Leurs inhibitions de départ sont nettement plus importantes. Ces courbes ont été effectuées avec les ACE 3000-II
Gouin

La courbe réalisée avec l'ACE 3000-II reste toujours à la limite supérieure des autres courbes, tandis que celle de l'ACE Gouin devient relativement vite la plus basse de toutes.

L'ACE 3000-II provient de la même extraction immunoperchlorique que l'ACE 3000-I, mais correspond à un pic différent en sortie de colonne de Séphadex G 200. Ceci est une démonstration de l'hétérogénéité de l'ACE. De plus une analyse biochimique récente montre que la composition de cette préparation est très différente en ce qui concerne la composition quantitative des acides aminés.

La grande inhibition observée aux taux de 2 et 3,9 ng/ml est difficilement explicable. Une hypothèse est qu'il y aurait davantage de sites antigéniques par unité de poids.

2 — Contrôle de pureté de diverses substances

Le protocole suivi est celui exposé précédemment à propos de l'inhibition du système ACE marqué anti ACE, par le NCA. On vérifie qu'une substance donnée est sans action sur la formation du complexe marqué. Rappelons que, en théorie, toute substance utilisée à des dilutions successives provoquant des inhibitions telles que la courbe obtenue est superposable à celle donnée par l'ACE, est de l'ACE.

a) Nous avons ainsi contrôlé un antigène nommé NCA II (128) qui présente une réaction croisée avec l'ACE.

Les doses employées sont 100, 1000, 5000 et 10000 ng/ml de la substance à contrôler. Comme il s'agit de détecter un contaminant éventuel, nous avons choisi d'emblée des concentrations élevées par rapport à celles que nous utilisons pour l'ACE.

La courbe d'inhibition est effectuée parallèlement à une courbe d'ACE.

Les résultats obtenus sont reportés en graphiques dans la figure n° 23. Nous pouvons voir que les points des deux courbes se superposent. Il intervient un facteur dix dans les concentrations pour obtenir les mêmes inhibitions. Le NCA II de cette préparation contient donc environ 10 % d'ACE, ce qui n'avait pas été mis en évidence par les techniques immunologiques classiques.

b) Nous avons par ailleurs pratiqué ce contrôle sur des extraits perchloriques de poumons destinés à rendre l'antisérum B11C monospécifique.

Nous rapportons ici les résultats trouvés pour l'un des échantillons analysés. Les chiffres de nos prises d'essai et les valeurs en ACE correspondantes sont réunis dans le tableau n° XXX. Les taux sont relativement élevés, puisqu'ils sont de l'ordre de 6 μ g/ml, pour une solution dont la concentration en protéines était de 20 mg/ml.

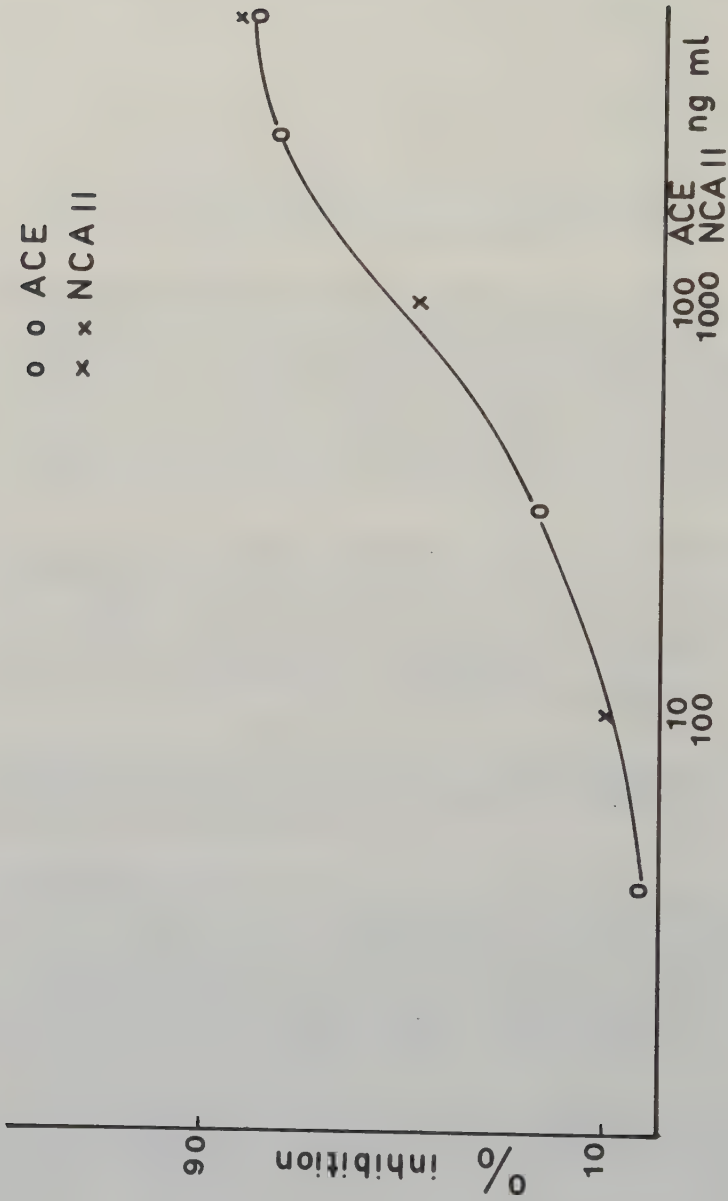


Figure n° 23

Courbes d'inhibition comparées de l'ACE et du NCA II

Dilutions Ext. Perchl. Poumon	% Inhibition	ACE ng/ml dilution
Pur	90,5	< 500
1/100	45	62,5
1/500	22	12
1/1000	14	5,5

Tableau n° XXX

Dosage de l'ACE dans un extrait perchlorique de poumon

3 — Contrôle de culture de cellules tumorales in vitro

Notre technique permet aussi de vérifier le maintien de la sécrétion de l'ACE par des cellules tumorales provenant de néoplasmes digestifs, et mises en culture in vitro.

Les dosages sont effectués sur les liquides surnageants. Une extraction perchlorique ou une concentration sont nécessaires, car l'ACE se trouve dilué dans un volume important.

Nous avons ainsi suivi l'évolution de six cultures, conjointement aux études microscopiques des cellules.

— Cinq de ces lignées étaient des essais du laboratoire de culture primaire de tumeurs coliques ou rectales. Ces cultures étaient en nappe, leur apparence généralement fibroblastique. Nous n'avons pas pu mettre d'ACE en évidence dans les liquides de culture.

— La sixième culture est une lignée permanente donnée par le Sloan Kettering Institute (New York), elle est de type épithélial, et fut d'abord faite en amas, puis en nappe. L'ACE a toujours été retrouvé dans les surnageants, en quantité variant de 0,8 à 1,5 ng/ml selon les essais.

Nous rapportons notre dernier résultat, qui a été réalisé sur le liquide surnageant concentré 500 fois (réduction de volume de 2.500 ml à 5 ml).

La gamme d'étalonnage est en milieu tampon.

Nous donnons nos prises d'essai et les résultats obtenus dans le tableau n° XXXI. En plus de la détermination de la teneur en ACE, nous pouvons y voir la confirmation d'avoir bien dosé cet antigène, puisque les taux trouvés dans les surnageants suivent linéairement les dilutions.

Dilutions surnageant concentré	% Inhibition	ACE ng/ml dilution	ACE ng/ml concentration	ACE ng/ml surnageant
Pur	95	illisible	—	—
1/4	87,5	100	400	0,8
1/10	66,7	35	350	0,7
1/20	43,7	15	300	0,6
1/50	26,5	7,8	390	0,78
1/100	12,2	3,9	390	0,78
1/200	9,5	2,5	500	1

Tableau n° XXXI

Dosage de l'ACE dans le surnageant
de cultures de cellules de tumeur digestive in vitro

B - APPLICATIONS CLINIQUES

1 — Sérums normaux

Afin de déterminer les taux limites normaux de l'ACE circulant, donnés par notre méthode, nous avons dosé l'antigène carcino-embryonnaire sur des sérums de donneurs de la Transfusion sanguine, dont nous connaissons le groupe et l'âge.

Le groupe est intéressant à connaître puisque certains échantillons d'ACE ont une réaction avec les anticorps dirigés contre la substance de groupe A (129).

Nous avons relevé l'âge à titre indicatif et nous n'avons pas remarqué de relation évidente entre les valeurs les plus élevées et l'âge.

Nous avons mesuré la teneur sérique de 100 sérums, chaque dosage étant réalisé en double. Les résultats donnés correspondent à la moyenne des deux essais. Nous avons classé nos résultats selon la concentration et nous avons fait le pourcentage de cas correspondant à chaque catégorie.

ACE ng/ml	2	2 à 3,9	3,9 à 5	5 à 6	> 6
Nombre de sérums	57	17	20	1	5

Il y a donc 57 % des sérums qui ont un taux d'ACE inférieur à 2 ng/ml, et 74 % inférieur à 3,9 ng/ml.

Nous avons choisi les chiffres des catégories en fonction des taux normaux trouvés par les différents auteurs, et qui se situent à 3,9 ng/ml comme limite supérieure, certains pensant que déjà au-delà de 2 ng, la valeur trouvée est pathologique. Il est important de noter que les sérums dont les valeurs se rangent au-delà de 6 ng/ml dépassent nettement le cadre considéré comme normal, puisqu'ils ont une concentration de 7,5 - 9 - 10 - 13 et 16 ng/ml, et on peut se demander s'il n'existe pas un processus pathologique non encore connu.

Il ne semble pas y avoir de différence selon le groupe sanguin, puisque le pourcentage général des taux est le même que celui retrouvé à l'intérieur de chaque groupe.

2 — Sérums pathologiques

Nous avons dosé l'antigène carcino-embryonnaire dans 110 sérums, dont la moitié étaient des sérums de malades atteints de maladies néoplasiques. Les résultats sont exposés sous forme de tableaux (n° XXXII et XXXIII).

La gamme d'étalonnage employée pour ces dosages a été réalisée en sérum humain normal, c'est-à-dire que l'ACE étalon a été mis en solution dans du sérum humain. Ce sérum utilisé seul sous un volume de 200 μ l produit une inhibition voisine de zéro, ce qui correspond à un taux en ACE inférieur à 2 ng par ml.

Dans ces conditions, le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire correspond à la mesure d'une différence entre le sérum que l'on étudie, et le sérum de la gamme étalon, mais on peut considérer que le chiffre obtenu est très voisin de la réalité puisque la quantité d'ACE apportée par le sérum normal dans la gamme est très faible.

D'autre part, si l'on ne procédait pas ainsi, la différence de précipitation du complexe marqué par le deuxième antiserum en milieu tampon lorsqu'il s'agit de l'antigène de référence, et en milieu sérique dans les autres cas, entraînerait une erreur plus importante que celle réalisée dans nos conditions opératoires.

En ce qui concerne les dosages, nous avons trouvé que parmi les 25 sérums de tumeurs colo-rectales, 8 ont un taux d'ACE sérique inférieur à 3,9 ng/ml, 12 ont un taux compris entre 4 et 30 ng/ml et 5 un taux très élevé dépassant parfois 100 ng/ml.

Dans les cancers gastriques, tous les sérums sauf un ont un taux supérieur à 3,9 ng/ml, ainsi que 3 sur 6 des cancers pulmonaires, 1 sur 2 des tumeurs du sein, de l'utérus et du pancréas.

Les maladies à caractère malin, comme la maladie de Hodgkin, et la maladie de Kahler ont également, dans nos expériences, un taux d'ACE circulant considéré comme élevé.

Dans le groupe des tumeurs malignes, nous avons classé deux cas de polyposé familiale un frère et une sœur de 18 et 20 ans opérés immédiatement après la prise de sang ayant servi au dosage, puisque nous savons que dans ce type de maladie, la cancérisation ultérieure est certaine. Les taux trouvés sont respectivement 10 et 12 ng/ml.

Parmi les maladies bénignes, un certain nombre de dosages dépasse

le taux de 3,9 ng/ml, en particulier dans les cirrhoses du foie (50 % des cas). Toutefois, dans les maladies bénignes, tous les taux sauf 3 sont inférieurs à 10 ng/ml.

Nos résultats concordent avec ceux publiés récemment par d'autres auteurs (130 à 136), aussi bien en ce qui concerne les tumeurs néoplasiques, que les maladies bénignes.

Nous ne voulons pas développer ici l'intérêt que l'on peut attendre en clinique des dosages sériques de l'ACE, nous voulons simplement exprimer que si l'antigène carcino-embryonnaire ne s'est pas montré aussi spécifique que les premiers dosages l'avaient laissé penser, on s'accorde généralement à dire qu'il y a cependant des taux au-dessus desquels le diagnostic de cancer est hautement vraisemblable.

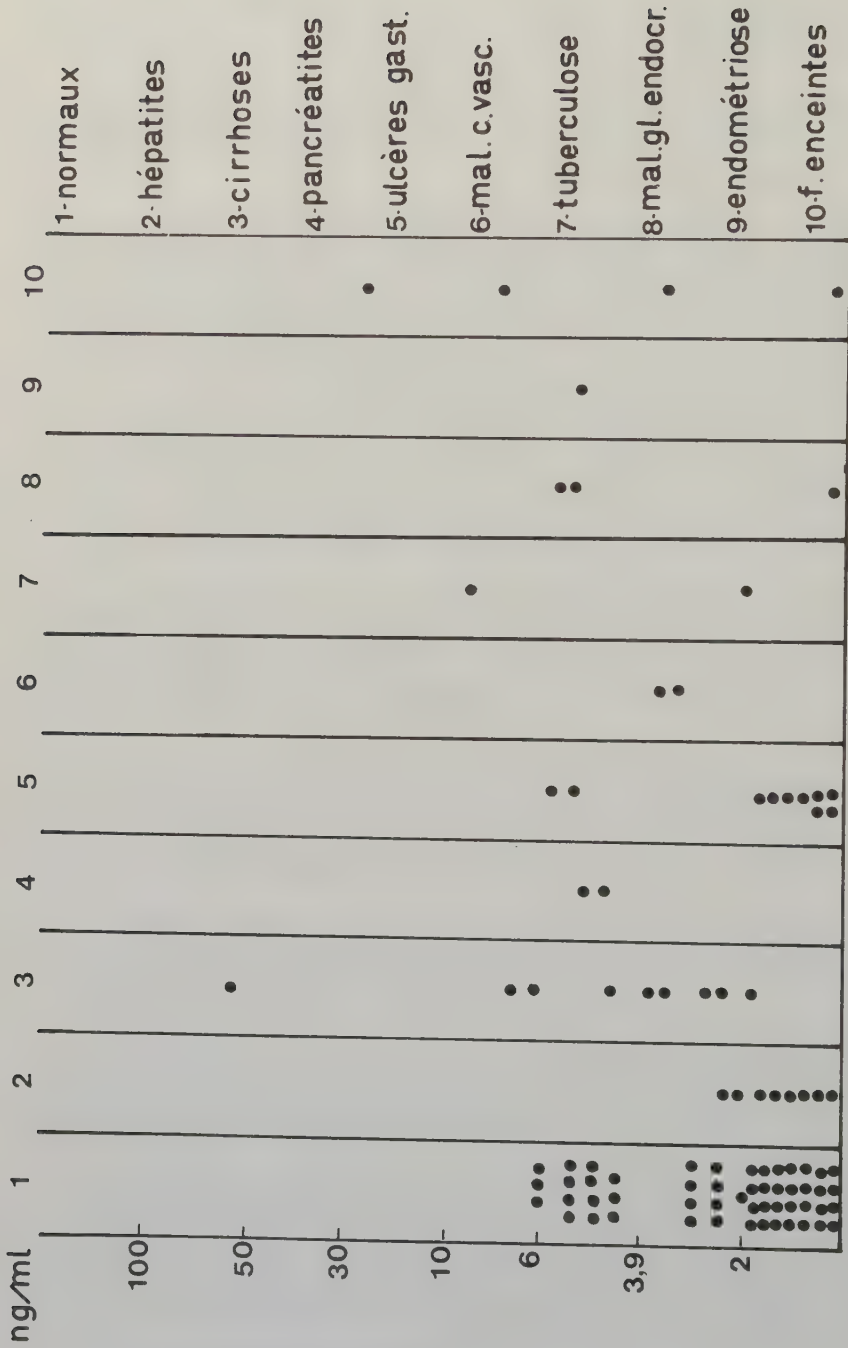


Tableau XXXII

Taux d'ACE sérique dans différents cas

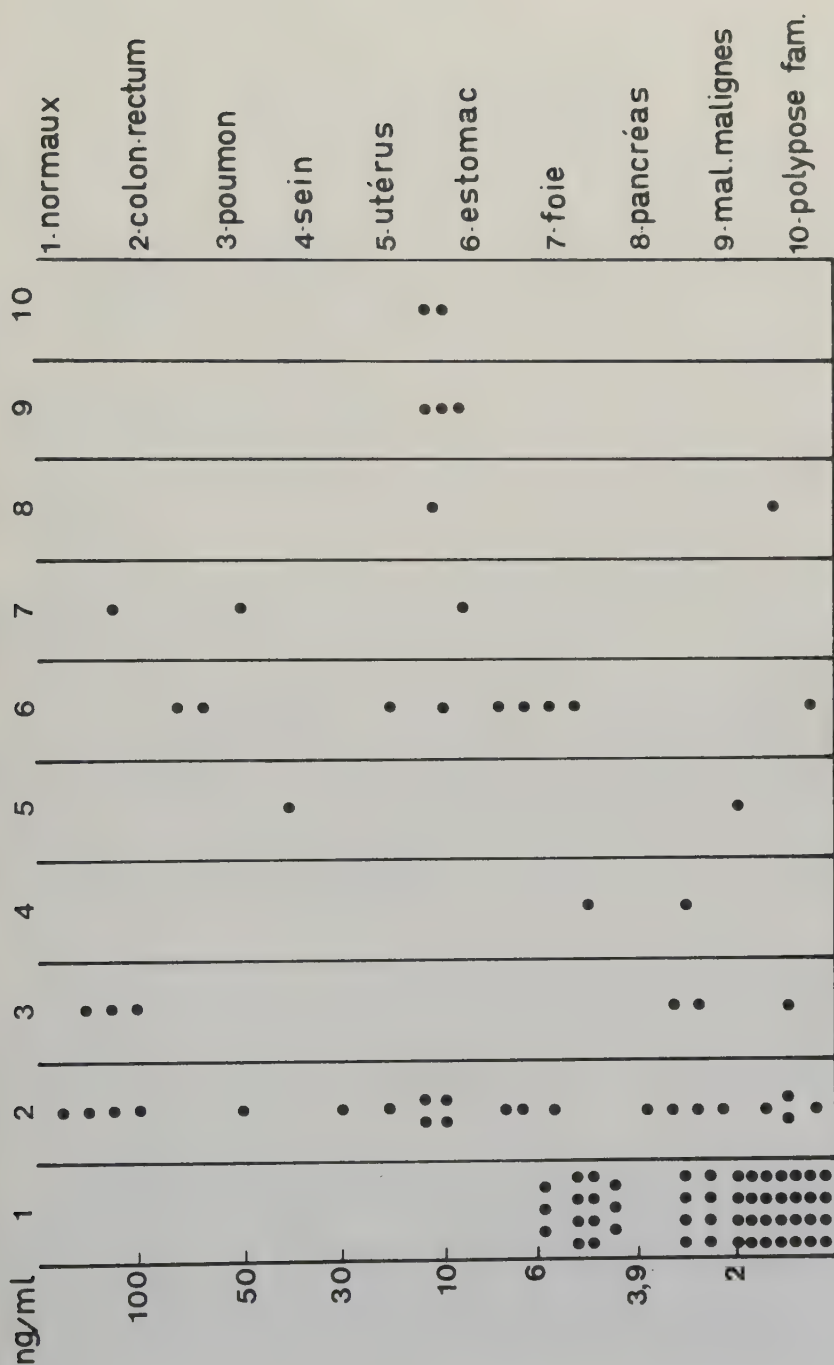


Tableau n° XXXIII

Taux d'ACE sérique dans des cancers divers

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de ce mémoire, nous avons rassemblé nos recherches concernant la mise au point d'un dosage radioimmunologique de l'antigène carcino-embryonnaire du système digestif (ACE).

Nous avons défini l'antigène carcino-embryonnaire et l'avons situé dans le cadre des antigènes associés aux tumeurs humaines.

Puis nous avons rappelé les principes généraux du dosage radioimmunologique.

Nous nous sommes attachée à faire une étude technique détaillée de chacun des éléments mis en jeu dans la réaction, ainsi que des conditions opératoires de chacune des méthodes essayées.

Notre part personnelle a été de définir, au moyen de réactifs préparés dans le service du Docteur BURTIN, un système de dosage, à partir de renseignements relevés dans la littérature. Nous ne saurions trop insister sur le fait que les techniques ne sont pas immédiatement applicables d'un système à l'autre c'est pourquoi, lors de notre mise au point, nous nous sommes orientée et avons approfondi les nombreuses modalités de réalisation de ce dosage.

Dans le chapitre des réactifs, nous avons élaboré un protocole de marquage et un mode d'isolement de la protéine radioactive qui garantit une radioactivité spécifique importante, compatible avec une bonne immunoréactivité, que nous avons toujours contrôlée systématiquement. Nous avons également déterminé la durée de validité de cette protéine en tenant compte de sa désiodation.

Nous pensons avoir suffisamment insisté sur la nécessité de la pureté de l'antigène. Nous avons vérifié l'identité des antigènes provenant de diverses tumeurs et purifiées par la même méthode dans le laboratoire du Docteur BURTIN. Nous les avons comparés entre eux et avec le premier échantillon d'un étalon international préparé en Angleterre. Nous avons discuté des résultats en fonction des données de l'analyse biochimique.

L'antisérum est un facteur très important de la sensibilité du dosage. Nous avons retenu un antisérum de brebis de qualité, aussi bien par sa teneur en anticorps, que par le volume fourni. Toutefois, il a l'inconvénient d'imposer un protocole de dosage long, à cause du temps de préincubation de 48 heures.

Pour le mode d'isolement du complexe antigène marqué-anticorps, nous avons adopté les techniques par précipitation au sulfate d'ammonium et au double anticorps. Réalisée en milieu sérique, la précipitation au sulfate d'ammonium entraîne de manière non spécifique dans les témoins de dosage, une quantité importante d'antigène radio marqué. Nous avons pallié cet inconvénient par un mode de calcul qui a le mérite de montrer la part réelle revenant au complexe marqué.

La technique au double anticorps quant à elle, demande une mise au point particulière afin d'équilibrer quantité du deuxième antisérum et temps de précipitation. Le système a parfois besoin d'une addition de sérum de l'animal ayant fourni le premier anticorps pour obtenir une séparation suffisante.

Dans le domaine des techniques, bien que la macro-étude soit adaptée aux dosages réalisés sur extrait perchlorique et reste couramment utilisée par certains auteurs, nous préférons employer la méthode que nous avons décrite sous le nom de micro-méthode.

Nous avons appliqué les dosages dans deux domaines ; pour vérifier d'une part, la pureté de l'ACE et celle de substances susceptibles d'être contaminées par lui au cours de leur préparation, pour étudier d'autre part, les variations cliniques du taux sanguin de l'ACE. Nous avons d'abord déterminé les teneurs sériques normales données par notre technique ; elles correspondent à celles de la majorité des auteurs. Puis, nous avons réalisé le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire sur des sérums de malades atteints de diverses affections bénignes et malignes. Nous avons trouvé un taux élevé dans 65 % des cancers du tube digestif (colon, sigmoïde, caecum et rectum), dans 80 % des cancers gastriques, et dans 50 % des néoplasmes du sein, de l'utérus, des poumons, et du pancréas. Dans les maladies bénigées, un pourcentage important (50 %) de taux pathologique est relevé dans les cirrhoses du foie (cirrhoses alcooliques), mais dans les autres cas, il est important de noter que les taux élevés sont l'exception, et que la majorité des sérums ont une teneur inférieure à 2 ng par ml.

BIBLIOGRAPHIE

- ABELEV G.D. and SVETKOV V.S. - (19) -
The immunofiltration method for elution of a specific antigen of a transplantable mouse hepatoma.
Probl. Onc. (N.Y.) 1960, 6, 856.
- ABELEV G. - (20) -
Study of the antigenic structure of tumors.
Acta Univ. Intern. Contra Cancer 1963, 19, 80.
- ABELEV G.D., PEROVA S.D., KRANKOVA N.J.,
POSTNIKOVA Z.A. and IRLIN I.S. - (21) -
Production of embryonal serum α globulin by the transplantable mouse hepatomas.
Transplantation 1963, 1, 174.
- ARRHENIUS S. and MADSEN T. - (63) -
The action of antitoxin upon toxin
C.J. SALOMONSEN : Contribution from the University laboratory for medical bacteriology to celebrate the inauguration of the state serum Institute.
KØBENHAVN OLSEN, 1902, 56-87.
- AVRAMEAS S. and TERNYNCK T. - (86) (108) -
The cross linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbants.
Immunochemistry 1969, 6, 53-66.
- BALE W.F., HELMKAMP T.P., DAVIS M.J., IZZO R.L.,
GOODLAND M.A., CONTRERAS and SPAR I.L. - (69) -
High specific activity labeling of protein with I¹³¹ by iodine monochloride method.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 122, 407-414.
- BALI J.P. - (61) -
Contribution à l'étude du mécanisme d'action des anti-gastrines.
Thèse, avril 1973.

BANJO C., GOLD Ph., FREEDMAN S.O. and KRUPPEY J. -
(48) (49) -

Immunologically active heterosaccharides of carcino
embryonic antigen of human digestive system.
Nature New Biol., 1972, 238, 183-185.

BANJO C., GOLD P., FREEDMAN S.O. and KRUPPEY J. - (51) -
Structure of the immunodominant tumor grouping of
carcino embryonic antigen (CEA) of the human diges-
tive system.
Federation Proceeding abstracts 1973, 32, n° 3, 1007.

BERSON S.A., YALOW R.S., BAUMAN A., ROTHSCHILD M.S.
and NEWERLY K. - (58) (91) -
Insulin I¹³¹ metabolism human subjects : Demonstra-
tion of insulin binding globulin in the circulation of in-
sulin treated subjects.
J. Clin. Invest. 1956, 35, 170-190.

BERSON S.A. and YALOW R.S. - (84) -
Quantitative aspects of the reaction between insulin
and insulin binding antibody.
J. Clin. Invest. 1959, 38, 1996-2016.

BERSON S.A. and YALOW R.S. - (64) -
Immunoassay of protein hormones
G. PINCUS, K.W. THIMANN and E.B. ASTWOOD -
The hormones, vol. IV, 1964, 557-630.

BERSON S.A. and YALOW R.S. - (70) -
Iodoinsulin used to determine specific activity of
iodine 131.
Science, 1966, 152, 205-207.

BERSON S.A. and YALOW R.S. - (60) (127) -
General principles of radioimmunoassay.
Clin. Chim. Acta 1968, 22, n° 1, 51-69.

BERTHOUX F.C. - (90) -
Le marquage des protéines par le radioiode.
Path. Biol., 1973, 21, n° 1, 83-97.

BOCCI V. - (89) -
Efficient labelling of serum proteins with ¹³¹I using
chloramine T.
Int. J. Appl. Radiat. 1964, 15, 449-456.

- BRUNFELDT K. and JØRGENSEN K.R. - (115) -
Some factors of significance in the double antibody
immunoassay of insulin.
Acta Endocr. 1967, 54, 347-361.
- BURR I.M., GRANT D.B., SIZONENKO P.C., KAPLAN S.L.
and GRUMBACH M.M. - (112) -
Some critical factors in double antibody radio-immuno-
assay systems utilizing sheep anti rabbit precipitating
sera for measurement of human serum LH FSH and
HGH.
J. Clin. Endocr., 1969, 29, 948-956.
- BURTIN P., von KLEIST S. and CHAVANEL G. - (36) -
Further studies on carcino embryonic antigens.
J. Nat. Cancer Inst. 1972, 35, 421-425.
- BURTIN P., MARTIN E. and SABINE M.C. - (37) -
Immunological study of polyps of the colon.
J. Nat. Cancer Inst., 1972, 48, 25-32.
- BURTIN P., CHAVANEL G. and von KLEIST S. - (57) -
Demonstration in normal human plasma of an antigen
that cross reacts with the carcino embryonic antigen
of digestive tract tumors.
J. Nat. Cancer Inst., 1972, 49, 1727-1728.
- BURTIN P., SABINE M.C. and CHAVANEL G. - (38) -
Presence of carcino-embryonic antigen in children's
colonic mucosa.
Inter. J. Cancer 1972, 10, 72-76.
- BURTIN P., von KLEIST S., SABINE M.C. and KING M. - (39) -
Immunohistological localization of carcino embryonic
antigen and non specific cross reacting antigen in gastro
intestinal normal and tumoral tissues.
Cancer Research, 1973, 33, 3299-3305.
- BURTIN P., CHAVANEL G. and HIRSCH-MARIE H. - (56) (128) -
Characterization of a second normal antigen that cross-
reacts with CEA.
J. Immunol., 1973, 111, n° 6, 1926-1928.
- BURTIN P. and CHAVANEL G. - (87) -
A new and fast method of preparation of CEA.
Ann. Immunol., 1973, 1246, 583-587.

- CATT K.J., NIALL H.D. and TREGAR G.W. - (98) -
Solid phase radio-immuno-assay of human growth hormone.
Biochem. J., 1966, 100, 31 c - 33 c.
- CATT K.J. and TREGAR G.W. - (99) -
Solid phase radio-immuno-assay M. Margoulies.
Protein and polypeptide hormones ; proceedings of
the international symposium LIEGE.
Excerpta Medica Foundation 1968, pp. 45-48.
- CHU T.M., REYNOSO G. and HANSEN H.J. - (134) -
Demonstration of carcino-embryonic antigen in normal
human plasma.
Nature 1972, 238, 152-153.
- COLIGAN J., LAUTEN SCHLEGER J. and EGAN M. - (40) -
Isolation and characterization of carcino embryonic
antigen.
Immunochemistry 1972, 9, 377-386.
- COLLATZ E., von KLEIST S. and BURTIN P. - (32) -
Further investigations of circulating antibodies in
colon cancer patients : on the auto-antigenicity of the
carcino embryonic antigen.
Int. J. Cancer 1971, 8, 298.
- DROUET J., HEGESIPPE M. and MERIADEC B. - (67) -
Marquage par l'iode radioactif des hormones protéiques
pour usage radioimmunologique.
Séminaire I.N.S.E.R.M. 1972, Techniques radioimmuno-
logiques, 523-531.
- DARCY D.A., TUBERVILLE C. and JAMES R. - (54) -
Immunological study of carcino embryonic antigen (CEA)
and a related glycoprotein.
Br. J. Cancer 1973, 28, 147-160.
- EGAN M.L., LAUTENSCHLEGER J.T., COLIGAN J.E. and
TODD C.W. - (118) (119) -
Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen.
Immunochemistry 1972, 9, 289.
- EKINS R.P. - (62) -
Theoretical aspects of saturation analysis I.A.E.A.,
S.M. 124-105. Proceeding of the symposium "In vitro"
procedures with radioisotopes in medicine (1969).

FARR R.S. - (110) -

A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I^+ BSA and antibody.
J. Inf. Dis. 1958, 103, 239-262.

FELBER J.P., MOODY A.J. and VANOTTI A. - (124) -

Radioimmunoassays II. An evaluation of the use of radioimmunoassay for the measurement of protein hormones.
Helv. Med. Acta 1966, 33, 378-387.

FRANCIS G.E., MULLIGAN W., WORMALL A. - (74) -

Labelling of proteins with iodine 131 sulphur 35 and phosphorus 32.
Nature (LONDON) 1951, 748-751.

GALSKOV A. - (126) -

Radioimmunochemical cortico tropin determination.
Acta Endoc. 1972, Suppl. 162.

GOLD Ph. and FREEDMAN S.O. - (1) - (23) -

Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption technique.
J. Exp. Med. 1965, 121, 439-462.

GOLD Ph. and FREEDMAN S.O. - (2) (24) -

Specific carcino-embryonic antigens of the human digestive system.
J. Exp. Med. 1965, 122, 467-481.

GOLD Ph. - (31) -

Circulating antibodies against carcino embryonic antigens of the human digestive system.
Cancer 1967, 20, 1163.

GOLD Ph., GOLD M. - (27) -

Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
Cancer Res. 1968, 28, 1331.

GOLD Ph., KRUPPEY J. and ANSARI H. - (29) -

Position of the carcino embryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumor cells surface.
J. Nat. Cancer Institut. 1970, 45, 219.

GOLD J.M., FREEDMAN S.O. and GOLD Ph. - (50) -

Nature (LONDON) 1972, 239, 60.

- GREENWOOD F.C., HUNTER W.M. and GLOVER J.S. - (81) -
The preparation of ^{131}I labelled human hormone of
high specific radioactivity.
Biochem. J. 1963, 89, 114.
- GRODSKY G.M. and FORSHAM P.H. - (96) -
An immunochemical assay of total extractable insulin
in man.
J. Clin. Invest. 1960, 39, 1070-1079.
- HALES C.N. and RANDLE P.J. - (85) (100) (103) (114) (116) -
Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate.
Biochem. J. 1963, 88, 137-146.
- HANSEN H.J., LANCE K.P. and KRUPPEY J. - (123) -
Demonstration of an ion sensitive antigenic site on
carcino embryonic antigen using zirconyl phosphate gel.
Clin. Res. 1971, 19, 143.
- HARBER E., PAGE L.B. and RICHARDS F.F. - (105) -
Radioimmunoassay employing gel filtration.
Anal. Biochem. 1965, 12, 163-172.
- HEDING L.G. - (97) -
A simplified insulin radioimmunoassay method
L. DONATO, G. MILHAUD and J. SIRCHIS - Labelled
proteins in tracer studies conference in PISA BRUSSELS.
Euratom 2950 d je 1966, p. 345-351.
- HELMKAMP R.W., RUTH L.G., BALE W.F., SPAR I.L. and
MUTSCHLER L.E. - (77) -
High specific activity iodination of gammaglobulin with
iodine ^{131}I monochloride.
Cancer Res. 1960, 20, 1495-1500.
- HERBERT V., LAU K.S., GOTTLIEB C.W. and BLEICHER S.J.
- (94) -
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J. Clin. Endocr. 1965, 25, 1375-1384.
- HIRSZFELD L., HALBER W. und LASKOWSKI J. - (16) -
Unter suchungen über die serologischen Eigenschaften
der Gewebe, I - über gruppenspezifische Differen-
zierung der Normal und Krebs gewebe.
Z. Immunitäts forsch. 1929, 64, 21.

- HIRSZFELD L., HALBER W. und LASKOWSKI J. - (18) -
 Untersuchungen über Verwandtschaftsreaktionen
 zwischen Embryonal und Krebsgewebe.
 II - Menschenembryo und Menschenkrebs.
 Z. Immunitätsforsch. 1932, 75, 209-216.
- HOLBURN A.M., MACH J.P., Mac DONALD and NEWLANDS M.
 - (129) -
 Studies of the association of the A, B and Lewis blood
 group antigens with carcino embryonic antigen, (CEA).
 Immunology 1974, 26, 831-843.
- HUGHES W.L. - (71) -
 The chemical requirements of a satisfactory label for
 proteins.
 DONATO L., MILHAUD G. and SIRCHIS J. -
 Labelled proteins in tracer.
 Conference in P.S. BRUSSELS -
 Euratom 2950, d, f, e, 1966, 3-14.
- HUGHES W.L. - (72) -
 The chemistry of iodination.
 Ann. (N.Y.) Acad. Sc. 1957, 70, 1-8.
- HUGUES W.L. and STRAESSLER R. - (73) (88) -
 Preparation and properties of serum plasma proteins
 XXIV. Iodination of human serum albumine.
 J.A. Chem. Soc. 1950, 72, 452-457.
- HUNTER W.M., GREWOOD F.C. - (78) -
 Preparation of iodine 131 labelled human growth hor-
 mone of high specificadicity.
 Nature 1962, 194, 495-496.
- HUNTER W.M. and GREWOOD F.C. - (106) -
 A radio-immuno-électrophoretic assay for human
 growth hormone.
 Biochem. J. 1964, 91, 43-56.
- KLEIST von S. et BURTIN P. - (3) (25) (26) -
 Mise en évidence dans les tumeurs coliques humaines
 d'antigènes non présents dans la muqueuse colique
 adulte normale.
 C.R. Acad. Sc. PARIS, 1966, 263, 1543-1546.
- KLEIST von S. and BURTIN P. - (4) (45) -
 Isolation of a fetal antigen from human colonic tumors.
 Cancer Res. 1969, 29, 1961.

- KLEIST von S. et BURTIN P. - (28) (30) -
 Localisation cellulaire d'un antigène embryonnaire de
 tumeurs coliques humaines.
 Int. J. Cancer 1969, 4, 874-879.
- KLEIST von S., CHAVANEL G. and BURTIN P. - (53) -
 Identification of an antigen from normal human tissues
 that crossreacts with the carcino embryonic antigen.
 Proc. Nat. Acad. Sci. (WASH) 1972, 69, 2492-2494.
- KRUPEY J., GOLD Ph. and FREEDMAN S.O. - (42) -
 Purification and characterization of carcino embryonic
 antigens of the human digestive system.
 Nature 1967, 215, 67.
- KRUPEY J., GOLD Ph. and FREEDMAN S.O. - (43) -
 Physicochemical studies of the carcino embryonic an-
 tigens of the human digestive system.
 J. Exp. Med. 1968, 128, 387.
- KUPCHIK H.Z., ZAMCHECK N. et SARAVIS C.A. - (13) (135) -
 Immunochemical studies of carcino embryonic antigens.
 Methodologic considerations and some clinical implica-
 tions.
 J. Nat. Cancer Inst. 1973, 51, 1741-1749.
- LAURENCE D.J.R., STEVENS U., BETTELHEIM R., DARCY D.,
 LEESE C., TURBERVILLE C., ALEXANDER P., JOHNS E.W.
 and NEVILLE A.M. - (136) -
 Evaluation of the role of plasma carcino embryonic anti-
 gen (CEA) in the diagnosis of gastro intestinal, mamma-
 ry and bronchial carcinoma.
 Br. Med. J. 1972, 3, 605-609.
- LAURENCE D.J.R., STEVENS U., DARCY D.A., TURBERVILLE
 C. and NEVILLE A.M. - (120) -
 Assay of the carcino embryonic antigen by a double
 antibody radioimmuno assay and the development of an
 assay for non specific cross-reacting antigen.
 International Atomic Energy Agency Symposium on
 radioimmuno assay and related procedures in clinical
 medicine and research (ISTANBUL 1973), sous presse.
- LEBEL J.S., DEODHAR S.D. and BROWN C.H. - (10) -
 Evaluation of a radioimmunoassay for carcinoembryo-
 nic antigen of the human digestive system.
 Cleveland Clinic Quarterly 1972, 39, 25-31.

- LOGERFO P., KRUPPEY J. and HANSEN H.J. - (7) (131) -
 Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia : assay using zirconyl phosphate gel.
 New Engl. J. Med. 1971, 285, 138-141.
- LOGERFO P., HERTER F.P. and BENETT S.J. - (33) -
 Absence of circulating antibodies to carcino embryonic antigen in patients with gastro-intestinal malignancies.
 Int. J. Cancer 1972, 9, 344-348.
- Mac FARLANE A.S. - (75) -
 Labelling of plasma proteins with radioactive iodine.
 Biochem. J. 1956, 62, 135-143.
- Mac FARLANE A.S. - (76) (82) -
 Efficient trace labelling of proteins with iodine.
 Nature 1958, 182, 53
- MACH J.P., CEROTTINI J. Ch. et ISLIKER H. - (44) -
 L'antigène carcino-embryonnaire du tractus digestif humain.
 Schweiz Med. Wschr. 1972, 102, 309-312.
- MACH J.P. and PUSZTASZERI G. - (55) -
 Carcino embryonic antigen (CEA). Demonstration of a partial identity between CEA, and a normal glycoprotein.
 Immunochemistry 1972, 9, 1031-1034.
- MACH J.P., PUSZTASZERI G., DISLY M., KAPP F.,
 BIERENS DE HAAN B., LOOSLI R.M., GROB P. et ISLIKER H.
 - (14) (121) -
 Dosage radioimmunologique de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) dans le plasma de malades atteints de carcinomes.
 Schweiz Med. Wschr. 1973, 103, 365-371.
- MARCHALONIS J.J. - (79) -
 An enzymatic method for the trace. Iodination of immunoglobulins and other proteins.
 Biochem. J. 1969, 113, 299-305.
- MARTIN F. et MARTIN M.S. - (35) (41) -
 Demonstration of antigens related colonic cancer in the human digestive system.
 Int. J. Cancer 1970, 6, 352-360.

- MARTIN F., KLEPPING C. et GUERIN J. - (11) (122) -
 Dosage radioimmunologique de l'antigène carcino embryonnaire circulant. Extraction immuno perchlorique du sérum.
 Arch. Franç. Mal. App. Dig. 1972, 61, 725-733.
- MEADE R. C. and KLITGAARD H. M. - (92) -
 A simplified method for immuno-assay of human serum insulin.
 J. Nucl. Med. 1962, 3, 407-416.
- MELANI F. - (93) -
 Radioimmunologische Bestimmung Von ACTH in serum
 DONATO L., MILHAUD G. and SIRCHIS J. - Labelled proteins in tracer studies conference in PISA.
 Brussels Euratom 2950 d f e 1966, 259-269.
- MIDGLEY A. R., REBAR R. W. and NISWENDER G. D. - (113) -
 Radioimmunoassay employing double antibody techniques.
 Acta endocr. 1969, 63, suppl. 142, 247-254.
- MILLER A. B. et HAMMOND E. C. - (12) -
 A collaboration study of a test for carcino embryonic antigen (CEA) in the sera of patients with carcinoma of the colon and rectum.
 Canad. Med. Ass. J. 1972, 107, 25-33.
- MOORE T. L., KUPCHIK H. Z., MARCON N. and ZAMCHECK N. - (130) -
 Carcino-embryonic antigen assay in cancer of the colon and pancreas and other digestive tract disorders.
 Amer. J. Dig. Dis. 1971, 16, 1-7.
- MORGAN C. R. and LAZAROW A. - (101) (104) (111) -
 Immunoassay of insulin : Two antibody system plasma insulin levels of normal, subdiabetic, and diabetic rats.
 Diabetes 1963, 12, 115-126.
- MYERS W. G. et VANDERLEEDEN J. C. - (68) -
 Radioiodine 125.
 J. Nucl. Med. 1960, 1, 149-164.
- REYNOSO G., CHU T. M., HOLYOKE D., COHEN E., NEMOTO T., WANG J. J., CHUANG J., GUINAN P. et MURPHY G. P. - (8) (132).-
 Carcino embryonic antigen in patients with different cancers.
 J. Am. Med. Assoc. 1972, 220, 361-365.

- ROSA A., SCASSELATI G.A. and PENNISI F. - (80) -
 Labelling of human fibrinogen with ^{131}I by electrolytic
 iodination.
 Biochem. Biophys. Acta 1964, 86, 519-526.
- ROSSELIN G., ASSAN R., YALOW R.S. and BERSON S.A. - (95) -
 Separation of antibody bound and unbound peptide hormones
 labelled with iodine ^{131}I by talcum powder and precipitated
 silica.
 Nature (LONDON) 1966, 212, 355-357.
- SKELLEY D.S., BROWN L.P. and BESCH P.K. - (107) (109) -
 Radioimmunoassay.
 Clin. Chem. 1973, 19, n° 12, 146-186.
- SKOM I.H. and TALMAGE D.W. - (102) -
 Non precipitating insulin antibodies.
 J. Clin. Invest. 1958, 37, 783-787.
- TATARINOV Yu S. - (22) -
 Content of embryospecific α globulin in the blood serum
 of human fetuses newborn and adult in primary cancer
 of the liver (en russe).
 Vol. Med. Khim 1965, II, 20.
- TERRY W.D., HENKART P.A., COLIGAN J.E. and TODD Ch. W.
 - (47) (52) -
 Structure studies of the major glycoprotein in preparations
 with carcinoembryonic antigen activity.
 J. Exp. Med. 1972, 136, 200-204.
- THOMSON M., KRUPPEY J., FREEDMAN S.O. and GOLD P. -
 - (5) (15) (34) (117) -
 The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic
 antigen of the human digestive system.
 Proc. Nat. Acad. Sci. (WASHINGTON) 1969, 64, 161-
 167.
- TUBERVILLE Ch., DARCY D.A., LAURENCE D.J.R.,
 JOHNS E.W. and NEVILLE A.N. - (46) -
 Studies on carcinoembryonic antigen (CEA) and a related
 glycoprotein, C.CEA - 2. Preparation and chemical
 characterisation.
 Immunochemistry 1973, 10, 841-843.
- WILBACH K.E. - (66) -
 Tritium labelling by exposure of organic compounds to
 tritium gas.
 J. Amer. Chem. Soc. 1957, 79, 1013.

WITEBSKY E. - (17) -

Disponibilität und Spezifität alcohollöslicher Strukturen
von Organen und bösartigen Geschwülsten.
Z. Immunität forsch. 1929, 62, 59.

YALOW R.S. - (125) -

Separation methods M. Margoulies : Protein and polypeptide hormones ; proceeding of the international symposium LIEGE.
Excerpta Medica Foundation 1968, pp. 627-630.

YALOW R.S. and BERSON S.A. - (65) -

Special problems in the radioimmunoassay of small polypeptide M. Margoulies : Proteins and polypeptide hormones ; proceedings of the international symposium LIEGE.
Excerpta Medica Foundation 1968, 36-44.

YALOW R.S. and BERSON S.A. - (59) (83) -

Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J. Clin. Invest. 1960, 39, 1157-1175.

ZAMCHECK N., MOORE T.L., DHAR P. and KUPCHIK H. Z.
- (9) (133) -

Immunologic diagnosis and prognosis of human digestive tract cancer : carcino embryonic antigens.
New Engl. J. Med. 1972, 286, 83-86.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I

A - L'antigène carcino-embryonnaire	p. 3
B - "CEA Like" substances	p. 8

CHAPITRE II - Le dosage radio-immunologique p. 9

A - Etude théorique	p. 9
B - Marquage des protéines	p. 18
C - Réalisation pratique générale	p. 23

CHAPITRE III - Dosage radio-immunologique de l'ACE : p. 27

Les réactifs p. 27

A -	L'antigène non marqué	p. 27
B -	L'antigène marqué	p. 29
1 -	Principe de la technique de marquage utilisée	p. 29
2 -	Mode opératoire	p. 30
A) Le marquage :	1) Réactifs	p. 30
	2) Mode opératoire	p. 32
B) Isolement de la protéine marquée		p. 33
C) Contrôle de stabilité de l'antigène marqué		p. 41

Discussion p. 43

C -	L'antisérum	p. 44
1 -	Préparation	p. 44
2 -	Contrôle des antisérums	p. 45
3 -	Titrage des antisérums	p. 47
a)	Incubation	p. 47
b)	Séparation du complexe antigène marqué-anticorps de l'antigène libre	p. 47
4 -	Interprétation des courbes de dilution	p. 68
	Discussion	p. 74

CHAPITRE IV - Techniques employées pour le dosage radio-immunologique de l'ACE	p. 77
I - Macro méthode	p. 77
A) Réactifs	p. 78
B) Protocole	p. 79
C) Résultats des courbes d'étalonnage	p. 79
1 - Antisérums de lapin	p. 79
2 - Antisérums de mouton	p. 83
Discussion	p. 85
II - Micro méthode	p. 86
A) Réactifs	p. 87
B) Etude des différents paramètres	p. 87
— Le tampon	p. 87
— La préincubation	p. 88
— Les protéines du milieu	p. 89
— La dilution de l'antisérum	p. 90
C) Protocole retenu pour la microméthode	p. 93
D) Etude critique de l'analyse	p. 93
a - Reproductibilité	p. 93
b - Spécificité	p. 93
1) Inhibition par le NCA	p. 93
2) Dilution de sérum	p. 95
Discussion	p. 97

CHAPITRE V - Applications du dosage radio-immunologique de l'ACE	
1 - Dosages par macro-méthode	p. 101
2 - Dosages par micro-méthode	p. 105
A) Applications non cliniques	p. 105
1 - Contrôle des préparations d'ACE	p. 105
2 - Contrôle de pureté de certains réactifs	p. 109
a) NCA	
b) Extrait perchlorique de poumons	
3 - Contrôle de culture de cellules tumorales in vitro	p. 111
B) Applications cliniques	p. 113
1) Sérums normaux	p. 113
2) Sérums pathologiques	p. 114

CONCLUSIONS GENERALES	p. 119
------------------------------	--------

